

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1933-1934. — N° 93

LE
PIGMENT MALARIQUE

Travail du Laboratoire de Médecine coloniale
(Professeur H. Bonnin)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 22 Décembre 1933

PAR

Jean GARBIÈS

ÉLÈVE DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Né à NICE (Alpes-Maritimes), le 2 octobre 1907.

Examineurs de la Thèse	{	MM. BONNIN, professeur.....	Président
		LABAT, professeur.....	{ Juges.
		AUBERTIN, agrégé.....	
		VITTE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DE L'UNIVERSITÉ
Y. CADORET, DELMAS, SUCCESSEUR
6, Place Saint-Christoly

—
1933



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548415_0094

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1933-1934. — N° 93

LE
PIGMENT MALARIQUE

Travail du Laboratoire de Médecine coloniale
(Professeur H. Bonnin)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 22 Décembre 1933

PAR

Jean GARBIES

ELÈVE DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Né à NICE (Alpes-Maritimes), le 2 octobre 1907.

Examineurs de la Thèse	{	MM. BONNIN, professeur.....	Président
		LABAT, professeur.....	Juges.
		AUBERTIN, agrégé.....	
		VITTE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DE L'UNIVERSITÉ
Y. CADORET, DELMAS, SUCCESSEUR
6, Place Saint-Christoly

—
1933

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

M. SIGALAS..... Doyen.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, W. DUBREUILH, RIVIÈRE, BARTHE,
DENIGÈS, AUCHÉ, SELIER, BEILLE, CASSAËT

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique médicale.....	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie.....	MANDOUL
id.....	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale.....	N.
Clinique chirurgicale.....	CHAVANNAZ.	Clinique ophtalmologique.....	TEULIÈRES
id.....	BÉGOUIN.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie..	ROCHER.
Pathologie et thérapeutiques générales...	CARLES.	Clinique gynécologique.....	GUYOT.
Clinique d'accouchements.....	ANDÉRODIAS.	Clinique méd. des maladies des enfants..	CRUCHET.
Anatomie pathol. et microscopie clinique.	SABRAZÈS.	Chimie biologique et médicale.....	DELAUNAY.
Anatomie.....	VILLEMIN.	Physique médicale et pharmaceutique....	SIGALAS.
Anatomie générale et histologie.....	G. DUBREUIL.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques.	BONNIN.
Physiologie.....	PACHON.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques	PETGES.
Hygiène.....	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires.	DUVERGEY
Médecine légale et déontologie.....	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales.	ABADIE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	PORTMANN.
Chimie.....	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée.....	LABAT.
Botanique et matière médicale.....	GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie..	GREYX.
Pharmacie.....	DUPOUY.	Clinique dentaire.....	CAVALIÉ.

MM. MICHELEAU (Médecine générale). MURATET (Anatomie pathologique). LACOSTE (Histologie).

PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). PAPIN (Chirurgie générale).

R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie.....	DUBECQ.	Chirurgie générale.....	CHARRIER.
id.....	DUFOUR.	id.....	LOUBAT.
Physiologie.....	FABRE.	Obstétrique.....	RIVIÈRE.
Médecine générale.....	AUBERTIN.	Ophtalmologie.....	BEAUVIEUX.
id.....	DAMADE.	Physique médicale.....	N.
id.....	PIÉCHAUD.	Dermatologie et syphiligraphie.....	JOULIA.
id.....	DELMAS-MARSALET.	Oto-rhino-laryngologie.....	N.
id.....	N.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.	VITTE
id.....	N.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire.....	PAPIN.	Puériculture.....	FAUGÈRE.
Physiologie.....	FABRE.	Démonstrations et préparations pharmac..	N.
Pathologie médicale.....	DELMAS-MARSALET.	Zoologie et parasitologie.....	R. SIGALAS.
Accouchements.....	RIVIÈRE.		
Ophtalmologie.....		MM. CABANNES (en congé).	
Ortopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes.		N.	
Cours complémentaire annexe. — Prothèse et rééducation professionnelle.....		GOURDON.	
id.....		DELGUEL.	
Clinique dentaire.....			

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.



A MON PERE — A MA MERE

A qui je dois tant, je dédie ce travail,
bien faible témoignage de mon immense
affection et de ma profonde reconnais-
sance pour tous les sacrifices qu'ils se
sont imposés pour moi.

A MON FRERE

A MES GRANDS-PARENTS

AUX MIENS — A MES AMIS

A MES CAMARADES DU CORPS DE SANTE
DES TROUPES COLONIALES

AUX DOCTEURS A. GAYRARD ET Y. ETHES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LABAT

*Professeur de Toxicologie et Hygiène appliquée,
Pharmacien des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

Que je remercie pour les conseils qu'il
m'a si obligeamment donnés au sujet de
cette thèse.

A MES MAÎTRES DE LA FACULTE
ET DES HÔPITAUX DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL DARGEIN

*Directeur de l'Ecole principale du Service de Santé de la Marine
et des Troupes coloniales,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

A MES JUGES

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. BONNIN

*Professeur de Médecine coloniale et de clinique des maladies exotiques
à la Faculté de Médecine de Bordeaux,
Médecin des Hôpitaux,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueux attachement et qu'il nous soit permis de le remercier pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette thèse et pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de la présider.

LE

PIGMENT MALARIQUE

AVANT-PROPOS

Au cours de l'infection palustre, on observe dans l'organisme deux sortes de pigments de nature différente : un *pigment ocre*, produit de transformation directe de l'hémoglobine, qui n'est pas spécial à la malaria et que l'on rencontre dans toutes les maladies s'accompagnant de destruction importante de globules rouges, et un pigment noir, d'origine plasmodiale, spécifique et caractéristique du paludisme : le *pigment malarique*.

C'est ce dernier que nous nous proposons d'étudier dans cette thèse.

En analysant les innombrables travaux qui, dans ces quarante dernières années, sont venus enrichir nos connaissances sur le paludisme, on est surpris de constater que l'étude du Pm n'y occupe qu'une bien modeste place, en France tout au moins. A peine trouvons-nous dans la littérature un seul article, très complet il est vrai, de Kelsch et Kiener, dans leur *Traité des maladies des pays chauds* de 1889. Depuis lors, seules quelques brèves mentions dans les traités de

pathologie et les ouvrages sur le paludisme signalent l'existence de ce pigment.

De nombreux auteurs étrangers, par contre, se sont attachés dans ces dernières années à son étude. Aussi avons-nous pensé, encouragé dans cette voie par M. le Professeur Bonnin, qu'il pourrait être utile de synthétiser tous ces travaux, d'énoncer, dans un exposé aussi clair que possible, les notions actuellement acquises sur ce point et d'y ajouter le modeste apport de nos recherches personnelles.

Nous nous excusons de donner à l'exposé historique un développement aussi important que nous l'avons fait, mais il nous a paru indispensable pour permettre de comprendre l'évolution des idées au cours des recherches entreprises sur l'origine et la nature du Pm.

C'est cependant l'étude aussi complète que possible des caractéristiques du Pm qui nous retiendra surtout. A dessein, nous serons très court sur la répartition anatomique du Pm dans l'organisme, chapitre qui se trouve longuement développé dans tous les traités, nous contentant de mentionner seulement les lésions macro et microscopiques les plus intéressantes. Nous exposerons brièvement les essais d'utilisation du Pm pour le diagnostic du paludisme, tentatives toutes récentes.

Enfin, nous nous sommes efforcé de donner une bibliographie complète des travaux relatifs au Pm, en négligeant cependant ceux qui n'ont plus qu'un intérêt purement historique ou qui se rapportent plus spécialement à l'anatomie pathologique du paludisme.

INTRODUCTION

Le terme de *pigment malarique*, que nous avons adopté, doit trouver ici sa justification.

Il n'est pas dans notre intention de vouloir créer un mot nouveau, puisque aussi bien c'est là un des noms sous lesquels le pigment paludéen est désigné communément par la majorité des auteurs modernes (*pigmento malarico*, *malarial pigment*).

Dans la littérature, cependant, on le trouve mentionné sous des dénominations nombreuses et variées. L'une, en particulier, a connu une grande fortune : celle de « *mélanine* », basée sur des propriétés histochimiques et suggérée par Meckel. Elle est encore employée de nos jours dans la plupart des traités classiques et par quelques auteurs (*pigmento mélanico* de Rísquez; *melanotische* et *melanotic pigment* des Allemands; *pigment mélanémique* de Kelsch et Kiener, etc.). Cette appellation impropre a été proposée et adoptée en raison du fait que, jusqu'à ces dernières années, on ne put réussir à mettre en évidence les réactions histochimiques du fer dans le Pm. « ... puisqu'il était difficilement libéré et qu'il ne donnait pas des réactions ferriques microscopiques, on l'appelait pigment mélanique ou mélanine », écrit Ascoli dans son ouvrage : *La Malaria*.

On comprendra que l'usage d'un tel terme, pour désigner le pigment propre au paludisme, doit être soigneusement évité si l'on veut bien se souvenir que, de nos jours, en anatomie pathologique et en chimie, on range sous le nom de « *mélanines* » un groupe de pigments noirs ou brunâtres, dont

la composition et les propriétés chimiques sont nettement définies et les produits de dédoublement bien connus. Ce groupe comprend les mélanines que l'on trouve dans certains organismes normaux (peau des races noires, poils, cheveux, choroïde, etc.), dans certains tissus pathologiques (mélano-sarcomes et tumeurs mélaniques).

Or, il est indiscutablement démontré à l'heure actuelle que le Pm n'est pas une mélanine et n'a avec elle d'autre rapport que celui de la couleur.

D'ailleurs, cette expression appliquée au Pm a perdu beaucoup de sa valeur depuis les premières recherches de Carbone.

Signalons enfin parmi les divers autres noms que l'on peut encore rencontrer, ceux de : hémomélanine (Askanazy), pigment hématique (Urriola), hémozoïne (Manson, Sambon, Castellani et Chalmers, Pimenta Bueno), plasmodine (Ross). Une telle diversité de noms ne peut servir qu'à jeter la confusion, et il nous a paru qu'une appellation unique ne pouvait offrir que des avantages, surtout si, par elle-même, elle suffisait à désigner clairement l'origine du pigment sans préjuger de sa nature ou de sa constitution.

Nous avons adopté le terme de Pm parce qu'il tend de plus en plus à se généraliser, mais nous reconnaissons qu'on pourrait tout aussi bien conserver l'ancienne dénomination de Laveran, de pigment noir palustre, qui est également satisfaisante.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Avant d'entreprendre cette étude, il nous paraît nécessaire de définir le terme de *mélanémie*, employé par les premiers auteurs étudiant le sang malarique, puisque la notion de Pm, à son origine tout au moins, lui est étroitement liée.

Le mot fut créé par Planer ⁽¹⁾ pour désigner un « ... état morbide constitué par la présence dans le sang de granulations pigmentaires ». Malgré la généralité d'une telle définition, il est hors de doute que, si l'on veut conserver à ce terme la signification qu'ont voulu lui donner la plupart des anciens auteurs, il faut en réserver exclusivement l'emploi pour le paludisme. Les auteurs qui ont cru constater cette mélanémie dans diverses autres affections (Stewens; Nepveu), se sont trouvés vraisemblablement en présence, soit de pigment ocre, soit de particules noirâtres provenant de tumeurs mélaniques et ayant pris naissance manifestement en dehors de l'appareil vasculaire.

La mélanémie palustre, altération constante et tout à fait caractéristique du paludisme, est constituée, elle, par deux éléments principaux : la présence dans le sang de pigment libre ou inclus dans des cellules et son accumulation dans les organes sous forme de dépôts.

(1) Planer (J.), *Ueber das Vorkommen von Pigment im Blute* (Zeitschr. der Gesellschaft der Aerzte zu Wien, 1834).

PÉRIODE D'OBSERVATION.

Il y a longtemps que les auteurs anciens avaient remarqué, à l'autopsie de sujets morts d'accès de fièvre pernicieuse ou intermittente, la teinte plus foncée que présentaient parfois certains organes (rate, foie, cerveau). Cette coloration noirâtre ou brunâtre particulière est notamment mentionnée par :

Torti (1712), Lancisi (1717), Stoll (1777), Monfalcon (1824), Bailly (1825), Billard (1825), Annesley (1828), Bright (1831), Maillot (1836), Stewardson (1841), Haspel (1850), etc.

Mais ces observateurs ne tirent de ce phénomène aucune conclusion et aucun ne pense à rattacher cette coloration à une lésion constante, caractéristique du paludisme.

Seul, le secours du microscope permettra de pouvoir reconnaître la nature réelle de ces altérations et d'acquérir les premières notions sur la genèse du Pm.

Dès lors, la question entre dans une phase nouvelle.

PÉRIODE THÉORIQUE.

A. — *Découverte du Pm; on suppose qu'il se forme dans la rate aux dépens de la matière colorante du sang.*

C'est Meckel ⁽²⁾ qui, le premier, en 1847, trouve dans le sang et les tissus d'un aliéné des corpuscules pigmentaires noirs dont l'accumulation dans les viscères donnait à ceux-ci une coloration brunâtre particulière. Il émet l'hypothèse que ces granules et ces petits amas de pigment pourraient vraisemblablement provenir de la rate, car ce dernier organe en est chargé et est très volumineux.

Deux ans plus tard, Virchow ⁽³⁾, confirme cette découverte

(2) Meckel (H.), *Ueber schwarzes Pigment in der Milz und dem Blute einer Geisteskranken* (Allg. Ztschr. f. Psychiatr. Berl., 1847, t. IV, p. 198-226, et cité par Virchow).

(3) Virchow (R.), *Die pathologischen Pigmente* (Archiv. f. pathol. anat., 1849, t. II, p. 587 et 594; Deutsch. Klinik. Berl., 1850). — *Pathologie cellulaire*, trad. franç., Paris, 1861, p. 184.

et constate la même lésion, mais cette fois chez un sujet atteint de cachexie palustre. Il trouve à l'autopsie une rate volumineuse et noirâtre et, de plus, signale que, dans le sang du cœur, le pigment noir se trouve incorporé dans des éléments cellulaires qui présentent une grande analogie avec les globules blancs.

Ces observations de coïncidence d'une rate noire et volumineuse avec un sang chargé de pigment ne tardèrent pas à se multiplier et eurent un grand retentissement, surtout en Allemagne. De nombreux travaux viennent bientôt confirmer et compléter ces faits.

Heschl (1850), Planer (1854), Walther (1857), décrivent avec soin les principales altérations rencontrées dans l'organisme de sujets morts de cachexie palustre ou de fièvres pernicieuses, au point de vue anatomique, clinique et physiologique.

Tigri ⁽⁴⁾ (1855) propose même de désigner l'affection du nom de « milza nera », d'après la coloration de la rate.

Mais c'est Frerichs ⁽⁵⁾ (1855) qui, reprenant toute la question, va lui donner son complet développement en poursuivant les recherches tant sur les caractères histologiques, le siège et l'origine du pigment, que sur son rôle dans la symptomatologie de l'« intoxication palustre ».

Le retentissement qu'eurent par la suite les travaux de cet auteur mérite qu'on les analyse succinctement :

Après avoir décrit les altérations produites par la mélanémie dans les différents organes, il étudie la distribution du pigment dans l'organisme et constate, tout d'abord, sa présence dans tous les organes. Il fait remarquer que, parfois, la rate est le siège unique du pigment; que, dans certains

(4) Tigri (A.), *Sul pigmento nella milza, nel fegato et nel sangue* (Gazz. méd. Ital. Tosc., 1855-1856, 3 s., I, p. 255; anal. in *Gaz. hebdom. de méd. et de chir.*, 1857, p. 386).

(5) Frerichs (Th.) *Die melanemie* (Zeitschr. f. Klin. medicin, 1855-1856, Bd VI, p. 321; *Klinik d. Leberkrankheiten*, 1861 [cet ouvrage renferme une bibliographie très complète des travaux antérieurs]). — *Traité pratique des maladies du foie*, 2^e éd. franç., Paris, 1866.

cas, on le rencontre seulement dans la rate et le foie, mais jamais dans la circulation générale sans que ces derniers organes ne soient eux-mêmes infiltrés de pigment.

Il reconnaît que le pigment circulant dans le sang est tantôt libre, tantôt inclus dans des éléments qui ne sont autres que des leucocytes; il signale même dans les vaisseaux du cerveau des « concrétions », hyalines, incolores, très réfringentes, dans lesquelles sont souvent inclus des grains de pigment. Il note, enfin, que les granules de pigment sont rarement isolés.

Mais surtout il met en valeur le rôle important que, selon lui, l'accumulation des éléments pigmentés dans les petits vaisseaux doit jouer dans la pathogénie de certains accidents qui se produisent au cours des fièvres palustres graves : les accidents cérébraux en particulier. Griesinger admettra également cette hypothèse, et nous verrons que cette nouvelle notion pathogénique introduite dans l'étude du Pm donnera lieu à une réaction de la part de l'Ecole française.

Malgré tous ces travaux, la nature et l'origine véritables des éléments pigmentés demeurent méconnues.

Frerichs, reprenant la théorie émise déjà par Meckel, conclut que le pigment se forme, pour la plus grande partie, dans les sinus veineux de la rate, aux dépens de la matière colorante du sang, par suite de la stagnation et de la décomposition de ce dernier à ce niveau. Il est cependant impuissant à expliquer pourquoi les hyperémies spléniques non paludéennes ne donnent pas lieu à la formation de pigment. et il suppose que cela tient, peut-être, à ce que la réaction acide du suc splénique exerce une influence sur la transformation de l'hématine.

Frerichs ne considère cependant pas la mélanémie comme une lésion constante, ni comme une altération spéciale du paludisme et il néglige l'altération primitive du globule rouge.

Griesinger⁽⁶⁾ suppose que le pigment ne se forme dans

(6) Griesinger, *Traité des maladies infectieuses*, trad. franç., Paris, 1868.

le sang que dans les cas de fièvre palustre grave ou du moins seulement en très petite quantité dans les fièvres intermittentes bénignes. Comme Frerichs, il pense que ce pigment provient très probablement de la matière colorante des globules rouges, qui se désagrège et se transforme en pigment dans les épithéliums des parois des vaisseaux. Dans le sang, il trouve le pigment enfermé dans des éléments qui ressemblent à des leucocytes et, selon lui, il n'en est libéré que par leur destruction.

Malgré cela, Griesinger ne considère la mélanémie que comme un phénomène accessoire et inconstant du paludisme, et il écrit que l'hypothèse d'un rapport entre la formation du pigment et le développement des accès est « peu vraisemblable ».

Ainsi, jusque-là, aucun auteur n'accorde une très grosse importance à la mélanémie et personne ne lui donne sa véritable signification pathologique.

Cette origine splénique du Pm va désormais être acceptée pendant plusieurs années, et elle sera reproduite avec les mêmes arguments par Grohe⁽⁷⁾ (1860) et Ball. A cette opinion se rallie également Hallopeau.

Colin⁽⁸⁾ dans son *Traité des fièvres intermittentes*, ne voit tout d'abord dans la mélanémie paludéenne qu'une pigmentation secondaire et banale des organes due à une transformation sur place de la matière colorante du sang. « D'ailleurs, ajoutait-il, la pigmentation est une lésion inconstante et la présence du pigment dans le sang est rare ». En 1872, il revient sur cette opinion, et déclare se rallier à l'origine splénique du pigment et à sa dissémination dans l'organisme par l'intermédiaire des cellules migratrices.

Ainsi donc jusqu'ici les auteurs sont unanimes à considérer que le pigment se développe aux dépens de la matière colo-

(7) Grohe (F.), *Virch. arch. f. path. anat.*, 1860, Bd XX, p. 306.

(8) Colin (L.), *Traité des fièvres intermittentes*, Paris, 1870, p. 346-347. Notes lues à l'Institut, 1872, et à la Société médicale des Hôpitaux, 12 déc. 1873.

rante du sang et qu'il trouve son origine dans la rate, où il se forme sous la double influence de l'accumulation des globules rouges et de leur destruction par l'action chimique du suc splénique. Puis, à partir de la rate, se feraient des sortes d'embolies pigmentaires et ainsi le pigment passerait dans le sang (mélânose hépato-splénique primitive et mélanémie secondaire).

Notons cependant que Rindfleisch⁽⁹⁾, en 1873, émet une théorie sur la formation du pigment, qui diffère sensiblement déjà de celle adoptée par Frerichs et Colin. Pour lui, le pigment dérive bien toujours de la matière colorante du sang, mais c'est de l'hématine transformée, condensée et précipitée sous forme de granules. Le pigment se forme, dit-il, « ... en dehors des vaisseaux », puis passe dans le sang, et le dépôt dans la rate ou le foie n'est que la conséquence d'une hyperémie considérable et persistante. Il paraît ainsi entrevoir que le Pm prend naissance dans le sang circulant, et non dans la rate.

Citons encore, pour mémoire, parmi les travaux sur la mélanémie, les observations de Lancereaux, simples rapports cliniques et histologiques, rapportées dans la thèse d'Iconomou (thèse Paris, 1865) et l'article que lui consacre Jaccoud dans son *Traité de pathologie interne*, 1871, t. II.

Mais le désaccord ne tarde pas à surgir entre les auteurs lorsqu'il s'agit de déterminer dans quelle partie du système vasculaire se forme le pigment.

B. — On suppose que le pigment se forme dans le sang circulant aux dépens de l'hémoglobine dissoute et qu'il se dépose secondairement dans les organes.

Arnstein⁽¹⁰⁾, en 1874, à la suite de nombreuses observations, cherche à montrer que l'opinion émise jadis par Virchow sur l'origine splénique du Pm, et par Frerichs n'est pas

(9) Rindfleisch (E.), *Traité d'histol. pathol.*, trad. franç., Paris, 1873, p. 200.

suffisamment fondée. Etudiant la distribution du pigment sur le cadavre, il fait un certain nombre de constatations qui avaient échappé à ses prédécesseurs :

1° le pigment n'est présent en assez grande abondance dans le sang qu'après un accès de fièvre, alors que la rate en renferme encore longtemps après le dernier accès; la mélanémie est donc un état très passager, et l'on peut en conclure que la rate n'est pas nécessairement le foyer d'où le pigment s'échappe pour passer dans le sang;

2° les organes où s'accumule le pigment (rate, foie, moelle osseuse) sont ceux, précisément, où vont se déposer les particules de substance injectées expérimentalement dans les veines (expériences de Neumann, Bizzozzero et Hoyer avec le cinabre).

On peut donc admettre, d'après ces faits, que le pigment existe primitivement dans le sang de la circulation générale, où il apparaît durant l'accès fébrile, et ce n'est que secondairement qu'il est transporté par les leucocytes et déposé dans des organes où la circulation est plus lente.

Au sujet de l'origine du pigment, il envisage un certain nombre d'hypothèses mais l'opinion qui lui paraît la plus vraisemblable est celle selon laquelle le pigment prend naissance dans le sang circulant et se forme directement aux dépens de la matière colorante, selon un processus de destruction des globules rouges qu'il ne peut expliquer.

En 1873, Kelsch met en doute l'origine exclusivement splénique du Pm après avoir paru l'admettre quelque temps auparavant, et il arrive à des conclusions analogues à celles d'Arnstein. Il reconnaît que les veines splénique et porte sont les parties du système vasculaire où l'on rencontre le plus de pigment et que plus l'on s'en éloigne du côté des vaisseaux périphériques, plus le Pm devient rare; mais il ne pense pas que ce fait soit de nature à donner à la rate le rôle important, dans la formation du pigment, que lui attribue la théorie classique. Il insiste sur l'analogie qui existe entre les

(10) Arnstein, *Virch. Arch. f. path. anat.*, 1874-1875, Bd LXI, p. 494.

substances injectées expérimentalement dans les veines et le pigment, dans leur répartition dans l'organisme. Etudiant les rapports du paludisme et de la mélanémie et recherchant les causes de cette dernière, il constate que l'apparition du pigment dans le sang est un phénomène *constant* dans le paludisme et *intermittent*, apparaissant au moment des paroxysmes aigus, pour disparaître quelques jours après.

Pour lui, c'est secondairement que le pigment se dépose dans les organes, et il se forme non dans la rate, mais dans le sang, aux dépens de l'hématine et par destruction des hématies. Insistant sur la très grande valeur diagnostique de la mélanémie, il conclut que les leucocytes mélanifères sont caractéristiques de cette altération et que leur présence peut permettre de poser le diagnostic des fièvres palustres.

Mosler (1877) ⁽¹¹⁾, à son tour, met en lumière le rapport qui existe entre la présence du pigment dans le sang et les accès fébriles.

PÉRIODE BACTÉRIOLOGIQUE.

A. — *On suppose encore que le pigment se forme dans le sang, mais on le considère comme étant un parasite, puis comme un produit élaboré dans le corps d'un parasite.*

Jusque-là, tous les auteurs sont d'accord pour considérer le pigment comme un produit dérivé de la matière colorante des globules rouges détruits pendant les accès fébriles. Mais rapidement, les observateurs, préoccupés à rechercher dans le sang l'agent parasitaire de la malaria, mirent cette opinion en doute.

C'est ainsi que Lanzi et Terrigi (1874) ⁽¹²⁾ rapprochent le pigment des granules rencontrés dans les cellules de certaines algues et essayent d'obtenir des cultures avec des grains de pigment provenant de la rate et du foie de sujets morts de malaria.

(11) Mosler, *Virch. archiv. f. path. anat.*, 1877, Bd LXIX, p. 369.

(12) Lanzi (M.) et Terrigi (G.), *Ann. di chim. applic. à med.*, Milano, 1874, LIX, p. 164-168.

En 1881, Afanassiew⁽¹³⁾ croit trouver aux grains de pigment des caractères morphologiques analogues à ceux présentés par certains microcoques chromogènes que Cohn venait récemment de découvrir. Il émet l'hypothèse de la nature parasitaire du pigment, sans toutefois pouvoir la confirmer par des cultures. La question en était là lorsque, vers la même époque, Laveran (1881-1884)⁽¹⁴⁾, entreprenant à son tour des recherches sur l'origine du pigment et des leucocytes mélanifères, fut amené, en étudiant le mode de formation des éléments pigmentés présents dans le sang, « lésion caractéristique et la seule constante dans le paludisme », à reconnaître leur nature parasitaire, et découvre l'hématozoaire du paludisme. Il fournissait ainsi l'explication si longtemps cherchée de la formation du Pm.

Ces éléments parasitaires, décrits par Laveran, vivaient dans le sang et se nourrissaient aux dépens de la substance des globules rouges, auxquels on les trouvait fréquemment accolés. Le pigment, apparaissant dans leur intérieur sous forme de granulations noirâtres, n'était donc qu'un résidu de la digestion de l'hémoglobine par le parasite, et, s'il avait toujours son origine dans le sang, du moins pensait-on qu'il se formait non dans le globule rouge lui-même mais dans les corps parasitaires accolés à ces hématies.

B. — *La formation du pigment est rattachée à l'évolution d'un parasite vivant dans l'intérieur du globule rouge.*

Un instant, Richard⁽¹⁵⁾ pensa que les parasites, et par suite le pigment, se développaient à l'intérieur de l'hématie, mais, en 1883 (*Revue scientifique*), il abandonne cette interprétation.

(13) Afanassiew (B.), *Virch. archiv. f. path. anat.*, Berl., 1881, Bd LXXXIV, p. 13-25.

(14) Laveran, *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme*, Paris, J.-B. Baillière, 1881; *Traité des fièvres palustres*, Paris, 1884.

(15) Richard, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1882.

C'est Marchiafava et Celli (1884)⁽¹⁶⁾ qui ont montré que la formation du pigment est conditionnée par l'évolution du parasite, vivant non pas en dehors, mais à l'intérieur même de l'hématie, aux dépens de laquelle il va se développer et dont il consomme l'hémoglobine. Le pigment qui apparaît ainsi dans l'intérieur du corps du parasite sous forme de grains ou de bâtonnets sera, par la suite, libéré lors de la destruction des globules rouges, et, passant dans la circulation générale, sera incorporé par les leucocytes, devenus « mélanifères ».

Ainsi le problème de l'origine du Pm, qui, pendant si longtemps, avait passionné les chercheurs, trouvait sa solution.

PÉRIODE DES RECHERCHES PHYSICO-CHIMIQUES.

Avec Marchiafava et Celli, qui furent les premiers à s'occuper vraiment de sa nature, nous entrons dans une nouvelle phase de l'étude du Pm, et de nombreux auteurs, étrangers pour la plupart, entreprennent des recherches physico-chimiques.

En 1891, Carbone isole le Pm de la rate d'un sujet paludéen, et l'obtient suffisamment pur pour pouvoir en étudier la nature chimique et en faire l'examen spectroscopique. Il conclut à l'identité probable du Pm et de l'hématine. On conçoit toute l'importance et la portée de ces résultats.

Dès lors, les travaux se poursuivent activement et les auteurs étudient le Pm soit dans les préparations histologiques de tissus, soit à l'état naturel, après l'avoir isolé de la rate de sujets morts de paludisme. A cause, peut-être, de la difficulté à obtenir un Pm absolument pur, la plupart des auteurs ont préféré employer la première de ces deux méthodes, plus

(16) Marchiafava (E.) et Celli (A.), *Atti della R. Acad. dei Lincei*, 1884 (*Arch. ital. de biol.*, t. V, 1884, p. 147-174; *Arch. clin. ital. Roma*, 1884, XIV, p. 263-268; *Select. Monog.*, 8°, London, 1888, p. 59-83).

(17) Celli (A.), *Bull. d. Soc. Lancisiana d. osp. di Roma*, 1884, IV, fasc. 4, p. 4-13.

facile et plus accessible mais, à coup sûr, moins décisive (Schaudinn, Rowley-Lawson, Seyfarth, Stevenson, Mayer, Glasunow, etc.).

La deuxième méthode, qui permet d'obtenir des résultats plus précis, a surtout été utilisée par :

Ascoli (1910), qui confirma les recherches de Carbone sur l'origine hématique du Pm et différençia nettement le Pm de la mélanine.

Brown (1911), qui démontra la présence du fer dans le Pm, et par Warasi (1927), qui mit définitivement au point une méthode d'extraction du Pm permettant de l'obtenir à l'état pur et indiqua sa formule élémentaire.

Si, sur de très nombreux points, les diverses recherches aboutissent à des résultats analogues, nous verrons, au cours de cette étude, qu'il en est d'autres sur lesquels l'unanimité est loin d'exister et que les discussions n'ont pas toujours donné toute la lumière qu'on pouvait en attendre. En particulier, le problème de la genèse et de l'élimination du Pm est loin d'avoir reçu une solution définitive.

CHAPITRE II

METHODE D'ISOLEMENT DU « Pm »

Parmi les méthodes préconisées pour extraire le Pm des tissus, celle de Warasi est la seule qui permette l'obtention d'un Pm pur. Elle est toutefois plus longue et plus complexe que les techniques employées par Carbone et par Ascoli.

On utilise comme matériel la rate, qui, de tous les organes, est le plus riche en Pm, soit à l'état frais, soit conservée dans un fixateur, mais en *prenant soin, dans ce cas, que ce dernier ne contienne pas de formol.*

Voici la technique de Warasi, que nous avons employée :

La rate paludéenne est coupée en petits morceaux, qui sont réduits en bouillie puis desséchés par chaleur lente, ou mieux encore par le procédé de l'étuve ventilée. On pulvérise finement le tout dans une capsule de porcelaine. (Il est nécessaire, au cours de l'opération, de maintenir toujours le matériel à une température constante, afin d'éviter que la poudre, qui est très hygroscopique, ne s'hydrate de nouveau.) La poudre ainsi obtenue est mise dans un verre à pied, et l'on y ajoute trois à quatre fois son volume d'eau distillée. Cette dernière se colore fortement par l'hémoglobine. On laisse reposer pendant vingt-quatre heures. On décante, on jette le liquide coloré, et, au précipité qui reste au fond du verre, on ajoute à nouveau de l'eau distillée. Après avoir agité énergiquement, on laisse reposer le tout pendant vingt-quatre heures. On répète cette opération jusqu'à ce que le liquide de lavage demeure incolore. On filtre alors le tout et on lave soigneusement le résidu à l'eau distillée. Ainsi l'hémoglobine, soluble dans l'eau, est éliminée.

Le résidu ainsi lavé est mis dans un verre à pied, où l'on ajoute une solution de soude à 2 p. 100, de façon que le volume du liquide soit dix fois plus grand que le volume initial du sédiment. Aussitôt le liquide se colore. On laisse reposer pendant quarante-huit heures, afin d'obtenir la dissolution de toute la substance. On filtre (1) alors le liquide, fortement coloré, et qui offre l'apparence du café. Sur le filtre, reste un résidu insoluble, constitué par des fragments de tissus, par de l'hémosidérine et divers autres pigments, résidu que l'on rejette.

Le filtrat est mis alors dans un verre à pied où l'on ajoute une quantité de magnésie égale à la moitié du volume du liquide. On agite soigneusement et fréquemment le tout. La magnésie se colore, puis se dépose après vingt-quatre à quarante-huit heures. Le liquide s'éclaircit alors de façon notable, et devient brun jaune au bout de deux à trois jours. On le décante, on ajoute de l'eau distillée au dépôt; on agite et l'on verse le tout sur un gros filtre résistant. Le dépôt qui reste sur le filtre est d'une couleur gris verdâtre; on le lave à l'eau distillée, jusqu'à ce que celle-ci sort incolore du filtre, et ensuite, plusieurs fois, avec une solution de soude à 2 p. 100. On lave finalement à nouveau avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le filtrat ne donne plus la réaction de l'albumine.

Le résidu ainsi lavé est mis dans une capsule de porcelaine résistante. On y ajoute un volume d'eau égal à cinq fois le volume du résidu. On agite soigneusement, puis on verse lentement de l'acide sulfurique concentré ou à 50 p. 100. (Il y a intérêt à opérer en plusieurs fois, par petites fractions.) La magnésie est dissoute et les grains de Pm apparaissent alors dans le liquide, à la surface duquel ils viennent surnager. Une fois la magnésie complètement dissoute, on ajoute un peu d'acide sulfurique pour acidifier le mélange et on laisse reposer vingt-quatre à quarante-huit heures. Le Pm se sédimente alors et va former un dépôt sous le liquide, devenu clair et légèrement rougeâtre, et dont on décante la plus grande partie. Avec le liquide résiduel, on agite le sédiment; on

(1) Il faut employer des filtres très résistants à cause de l'alcalinité du liquide

filtre. Le dépôt est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que disparaisse la réaction acide. Recueilli dans une capsule de porcelaine, on le met à sécher dans une étuve à 37 degrés.

Une fois sec, le Pm est mis dans un récipient en verre et recouvert d'alcool à 96 degrés, avec lequel on l'agite fréquemment. Après un repos de vingt-quatre heures, le Pm s'amasse en petits flocons. On décante l'alcool qui s'est coloré. On répète l'opération tant que l'alcool se colore. On sépare ainsi du Pm les autres pigments hématogènes qui sont solubles dans l'alcool, l'hématoporphyrine en particulier.

Au Pm ainsi obtenu on ajoute du chloroforme et l'on agite. Après vingt-quatre heures de repos, on ajoute un égal volume d'éther pour faire sédimenter le Pm surnageant. On décante le liquide, et au dépôt on ajoute de l'éther. On agite. L'éther est décanté après un repos de vingt-quatre heures. Cette opération sera répétée jusqu'à ce qu'une goutte d'éther déposée sur une lamelle s'évapore sans laisser aucune trace de graisse.

Ainsi l'isolement du Pm est terminé et l'on peut, dès lors, l'analyser comme une substance chimique.

Toutes ces opérations demandent un délai d'au moins deux mois et la quantité de Pm obtenue est toujours minime par rapport au volume de rate employée.

Le principe sur lequel est basée cette méthode d'extraction est le suivant :

Après libération de l'hémoglobine soluble dans l'eau, le Pm est séparé des débris de tissus à l'aide de la soude dans laquelle il est soluble. Le Pm ayant une propriété acide, on ajoute au liquide de la magnésie, qui possède des propriétés alcalines, faisant ainsi subir au Pm le phénomène de l'« adsorption polaire » (Michaelis). Dans le liquide, se trouvent des albumines provenant des tissus, qui sont des électrolytes amphotères (Cohnheim) et demeurent indifférentes à l'adsorption polaire (hypothèse vérifiée par plusieurs expériences de Warasi). Par de nombreux et soigneux lavages, l'albumine est facilement séparée de la magnésie. Le Pm est

finalement extrait par dissolution de la magnésie dans l'acide sulfurique. Les divers autres pigments hématogènes qui se trouvent dans la solution sont éliminés grâce à leur solubilité dans l'alcool. L'hémosidérine, à cause de ses propriétés alcalines (Hueck), ne se dissout pas dans les alcalis et est rejetée avec les résidus de tissus. Le Pm est enfin débarrassé des corps gras par le chloroforme et l'éther.

CHAPITRE III

ETUDE DES CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES DU « Pm »

I. — *Propriétés physiques.*

a) MORPHOLOGIE.

Le Pm isolé par la méthode de Warasi se présente sous forme d'une poudre amorphe, et jamais cristallisée, de couleur brun noirâtre avec une nuance olive. Elle n'est pas hygroscopique et, à l'examen microscopique elle apparaît constituée par de petits grains et de petits amas de taille et de forme différentes, à contours mousses.

Les grains de Pm présenteraient le phénomène de la biréfringence à la lumière polarisée (Schaudinn, Seyfarth, Mülhens, Marchoux). Mais cette particularité est contestée par Kaiserling et Glasunow, qui l'attribuent à un éclairage défectueux.

Par l'examen entre deux nicols croisés, les grains de Pm se distinguent sur le fond noir comme des cristaux lumineux.

Enfin, le Pm est dicroïque en solution de carbonate de sodium (Carbone).

b) EXAMEN SPECTROSCOPIQUE.

Le parallélisme entre la solubilité du Pm et de l'hématine, signalé par Carbone, amena Brown à faire un examen spectroscopique du Pm. Pour éviter toute cause d'erreur, il rechercha un solvant du Pm sans action sur l'hémoglobine et utilisa dans ce but une solution de potasse alcoolique à

0,04 p. 100. Après avoir desséché puis pulvérisé un morceau de rate paludéenne, on traite par la potasse alcoolique et l'on filtre : le filtrat, de couleur marron, contient le Pm en dissolution. Les résultats obtenus par Brown sont les suivants :

- 1° l'examen spectroscopique de cette solution alcaline de Pm montre une seule bande commençant vers D et s'étendant vers la gauche du spectre, où elle s'estompe graduellement dans le rouge entre C et D : c'est là le spectre de l'hématine alcaline;
- 2° en acidifiant la solution, on trouve également une seule bande dans le spectre, qui se prolonge vers la gauche : c'est le spectre de l'hématine acide;
- 3° la solution réduite par le réactif de Stokes présente dans le vert les deux raies caractéristiques de l'hémochromogène;
- 4° la solution mère additionnée d'acide sulfurique concentré ne montre aucune bande d'absorption, mais, évaporée, donne un résidu noir verdâtre qui, additionné d'acide sulfurique concentré, présente les deux bandes caractéristiques du spectre de l'hématoporphyrine : l'une à la gauche de D, et l'autre entre D et E.

Ainsi l'examen spectroscopique du Pm confirme les résultats obtenus par Carbone et ne laisse aucun doute sur sa nature hématique.

Seyfarth, après Brown, trouve le spectre de l'hématine dans une solution alcool-alcaline de Pm extrait d'une rate.

Steinfeld, par le même procédé, fait des constatations identiques à celles de Seyfarth (bande d'absorption vers la graduation 60 du micromètre).

Kósa décrit dans le spectre une bande d'absorption principale entre C et D, qui se prolonge au delà de D (environ au milieu de λ 600).

Les recherches de Glasunow, partiquées selon la méthode de Brown, confirment les résultats précédemment obtenus.

Enfin, pour Warasi, l'examen spectroscopique ne donne pas d'image caractéristique, mais on trouve une bande d'absorption diffuse entre D et C; le Pm en solution dans l'acide acétique donne une bande plus étroite que dans une solution alcaline.

Ainsi, le spectre du Pm se rapproche de celui de l'hématine du fait que l'on peut obtenir, en partant d'une solution de Pm, les diverses bandes d'absorption caractéristiques de l'hématine, en particulier celle située entre D et C, qui est constante.

II. — *Propriétés chimiques.*

Le Pm est :

1° *Insoluble* dans :

l'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme (Carbone, Ewing, Ascoli, Hueck, Seyfarth, Glasunow, Warasi, Kósa, Wats et White);

l'acide chlorhydrique et sulfurique (Brown, Hueck, Seyfarth, Glasunow, Warasi, Wats et White) et dans l'acide azotique (Brown, Hueck, Warasi); mais Rocchi et Glasunow nient cette insolubilité dans l'acide azotique, et ce dernier soutient même que cet acide le détruit très vite;

l'oxalate de potassium à 20 p. 100, le citrate de sodium à 40 p. 100, le sulfate d'ammonium en solution saturée (Rocchi);

le sulfure de carbone (Ewing), les acides organiques et les solutions salines (selon Ascoli).

2° *Peu soluble* dans :

l'éther et l'alcool acidifiés à 20 p. 100 avec l'acide chlorhydrique et l'acide acétique (Carbone, Ascoli, Brown, Hueck, Stevenson, Glasunow, Warasi, Rocchi).

Toutefois il serait assez soluble dans l'éther chlorhydrique

à 20 p. 100 pour Rocchi; par contre, Wats et White considèrent que le Pm est insoluble dans l'alcool-acidifié.

A ce sujet, Stevenson a insisté sur le fait que l'alcool acidifié (1 p. 100 d'acide chlorhydrique dans l'alcool) fait disparaître en quatre heures tout le Pm contenu dans les coupes, alors que la solution d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 employée seule pendant onze heures est sans effet. Du point de vue pratique, il est donc désirable que l'alcool acidifié ne soit jamais employé pour traiter des coupes lorsque celles-ci ont pour objet la recherche du Pm, car son emploi même pendant un temps très court fait disparaître les plus fines granulations.

l'acide acétique (Warasi). Toutefois il y serait assez soluble pour Rocchi et l'acide concentré dissoudrait le Pm très vite à chaud (Glasunow).

3° Soluble dans :

les solutions de potasse et de soude à 10 p. 100, dans lesquelles il précipite par addition d'un acide (Ascoli), ce qui permet ainsi de l'isoler;

la potasse alcoolique (Brown, Hueck), qui fait disparaître des coupes le précipité formolé et qui est un excellent dissolvant du Pm;

les solutions saturées de carbonate de sodium, de carbonate de potassium et de carbonate de lithium (Ascoli, Brown, Hueck, Seyfarth, Warasi, Wats et White);

l'ammoniaque (Brown, Seyfarth, Vernoni, Warasi);

le sulfure d'ammonium (Ewing, Brown, Kiener, Rocchi), qui le dissout rapidement;

l'acétate de fer (Warasi), mais plus lentement que l'hématine;

l'uréthane éthylique à 25 p. 100, le chlorhydrate basique de quinine à 10 p. 100 et le chlorhydrate neutre à 25 p. 100 (Rocchi);

le xylol (Rowley-Lawson). Rocchi et Wats et White esti-

ment cependant que le Pm est insoluble dans ce dernier corps, tout au moins durant le temps nécessaire pour enlever la paraffine des coupes.

Pour Brown, le Pm n'est décoloré ni par l'eau oxygénée, ni par le permanganate de potassium; mais sur des coupes il disparaîtrait totalement en quelques heures, par action de l'eau oxygénée à 30 p. 100, et il y aurait là un véritable phénomène de dissolution. « La décoloration pourrait cependant être obtenue avant la dissolution, ajoute-t-il, en employant une solution d'eau oxygénée à 3 p. 100. »

Pour Hueck, Seyfarth, Rocchi, Wats et White, il est très peu soluble dans l'eau oxygénée, qui le décolorerait. Glasunow, qui a repris l'étude de cette question, est d'avis que sous l'action de l'eau oxygénée le Pm se décolore très vite et se dissout.

Enfin, le Pm est *partiellement soluble* dans : la pyridine (Vernoni, Glasunow), l'aniline (Glasunow; Rocchi l'a pourtant trouvé insoluble dans l'huile d'aniline) et la solution à 4 p. 100 de quinine dans le chloroforme (Glasunow).

Toutefois la solubilité dans tous ces solvants est lente.

Ajoutons que le Pm, corps très stable, ne serait pas modifié par le pus tuberculeux (Seyfarth) et qu'il n'est pas détruit par la putréfaction (Mosto).

Le Pm donne les réactions du fer, et cette propriété primordiale fera plus loin l'objet d'un chapitre spécial.

Il ne donnerait pas les réactions du soufre, ni du phosphore (Warasi), et cependant Stefani y a trouvé du soufre.

Nous devons à l'obligeance de M. le Professeur Labat, qui a bien voulu rechercher la présence du soufre dans un échantillon de Pm extrait par nous d'une rate paludéenne, selon la méthode de Warasi, d'avoir pu vérifier nous-même cette dernière affirmation :

0 g. 20 de Pm ont été fondus, jusqu'à fusion de la masse et obtention de cendres blanches, avec leur poids d'un mélange à

parties égales de nitrate et de carbonate de potassium pur. La masse a été reprise par 10 cm³ d'eau distillée; on a filtré et ajouté de l'acide chlorhydrique pur jusqu'à réaction très légèrement acide. Le liquide ainsi obtenu, additionné de 0 cm³ 5 de réactif de Marty (solution chlorhydrique de chlorure de baryum), n'a fourni aucun précipité de sulfate de baryum.

En conséquence nous pouvons conclure que le Pm ne contient pas de soufre, car, dans les conditions de l'expérience, cet élément aurait fourni un sulfate alcalin, et, par suite, un précipité de sulfate de baryum.

Cette absence de soufre dans le Pm répond bien, d'ailleurs, au fait que « la globine contient tout le soufre de l'hémoglobine et n'en perd rien quand elle se sépare de l'hématine » (Kaiser) (1).

III. — *Techniques tinctoriales employées pour différencier le Pm sur des coupes histologiques.*

Bien que Missirolì ait prétendu que le Pm était un signe de peu de valeur dans les préparations colorées, car il se voit alors difficilement, un certain nombre de détecteurs ont été utilisés, que nous allons rapidement passer en revue.

Tout d'abord, il n'est pas colorable par les colorants basiques et les colorants des graisses et des lipoides (Hueck, Glasnow); en particulier, pas de coloration par l'acide osmique.

Wats et White ont prétendu que le Pm deviendrait brun quand on le traite par les alcalis et prendrait une coloration rouge si l'on fait agir d'abord un acide, puis un alcali; ils considèrent cette recherche comme un test spécifique du Pm dans les tissus.

La coloration par le carmin, recommandée par Daniels et Newham, ne donne pas de résultats excellents, mais offre seulement l'avantage de permettre un contraste entre les

(1) Kaiser, *Bioch. Zeitschrift*, Bd 192, 1928, p. 38-66, cité par Lerper (M.) et Bory (L.), *Le soufre en biologie*, Doin, Paris, 1932.

granules de Pm et les protoplasmas cellulaires, qui sont colorés faiblement.

L'imprégnation argentique permet de différencier les pigments dans leur aspect morphologique; mais tandis que, par cette méthode, le pigment ocre se colore intensément, la réduction argentique est négative pour le Pm (Hueck). Il en est de même avec l'hématoxyline-éosine.

Avec la méthode de Unna ⁽²⁾, qui colore électivement et intensément les pigments sanguins, le Pm reste incolore.

Enfin, avec le ferrocyanure de potassium en solution à 2 p. 100, qui est un révélateur du fer, puis traitement avec l'alcool chlorhydrique après vingt-quatre heures d'étuve à 40 degrés (Stieda, Fontana, Del Rio Hortega, etc.), les pigments qui dérivent de l'hémoglobine acquièrent une couleur bleue de tonalité variable ou verdâtre, en forme de petites taches ou de zones diffuses, quel que soit leur siège. Nous verrons, à propos de la question du fer, quels sont les résultats que donne cette technique avec le Pm.

Analyse et formule élémentaires.

La composition chimique élémentaire du Pm est, pour Warasi, la suivante :

C	51	p. 100
H	7,6	p. 100
N	13,5	p. 100
O	22,5	p. 100
Fe	2,9	p. 100

d'où l'on peut tirer la formule empirique : $C_{84}H_{152}N_{20}FeO_{28}$, formule qui diffère de celle de l'hématine.

(2) Fuschine carbonique et bleu de méthylène polychrome avec différenciation par une solution concentrée de tanin.

V. — *La question du fer.*

La question de la présence ou de l'absence de fer dans la molécule du Pm, d'un intérêt capital pour la détermination de sa nature chimique, est une de celles qui ont soulevé le plus de discussions.

Les auteurs qui se sont attaqués à cette étude ont employé deux méthodes de recherche pour déceler le fer :

Les uns — et ce sont les plus nombreux — ont étudié la façon dont se comportait vis-à-vis de certains réactifs (réaction du bleu de Prusse en particulier) le Pm qui se trouve dans les préparations histologiques et les préparations de sang;

Les autres ont recherché directement la réaction chimique du fer dans les cendres du Pm.

a) ETUDE SUR LES PRÉPARATIONS HISTOLOGIQUES D'ORGANES RENFERMANT DU Pm.

Les premiers auteurs qui recherchèrent la présence du fer au moyen des réactions micro-chimiques habituelles (coloration bleue caractéristique avec le ferrocyanure de potassium en milieu acide), trouvant la réaction du bleu de Prusse négative, en conclurent que le Pm était privé de fer (Dock, Boisson, Marchiafava et Celli, Ewing, Milner, Ameuille, Askanazy, Castellani et Chalmers, Ch. Basu, Charu, Marchoux, Schmörl, Lubarsch, etc.).

Kelsch et Kiener, Hueck, estiment que le fer n'est pas décelable, ou que, du moins, la réaction est négative avec les réactifs ordinaires.

Pour Stieda, la teneur en fer est inconstante.

Mosto n'obtient pas des réactions constamment positives.

D'autres auteurs, Lignac et Glasunow en particulier, pour des raisons sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir, se rangent également à cet avis.

Cette notion de la négativité des réactions histochimiques du fer est, dès lors, presque unanimement admise. On a vu,

par ailleurs, qu'elle avait contribué, à faire adopter le terme de « mélanine » pour désigner le Pm, et, pendant longtemps, ce sera une des particularités les plus caractéristiques du Pm.

Il convient cependant de signaler que, dès 1897, Laveran, malgré qu'il ait obtenu des réactions négatives, fait des réserves sur la valeur d'une telle méthode de discrimination et écrit : « ... il est probable que le pigment palustre contient du fer, comme le pigment ocre, mais sous une forme différente, difficile à déceler. » « Il serait intéressant, ajoute-t-il, de résoudre ce petit problème. »

En 1914, Brown s'élève contre l'opinion admise jusqu'alors et, le premier, indique qu'il est possible d'obtenir une R. Fe positive en remplaçant l'acide étendu par une solution d'alcool acidifié. Il recherche la réaction sur des coupes contenant le Pm, en utilisant des solutions de ferrocyanure et d'alcool chlorhydrique à 2 p. 100; il met ainsi en évidence un large halo bleu autour des granulations de Pm.

A vrai dire Hueck, par la réaction de Turnbull modifiée, avait constaté également l'apparition de ces anneaux bleus, mais considérait qu'ils étaient conditionnés par l'adjonction d'hémosidérine au Pm. Aussi, pour obvier à cette objection, Brown élimine la possibilité de la présence de fer provenant de l'hémosidérine en traitant préalablement le Pm par une solution d'acide oxalique à 2 p. 100 agissant pendant douze heures (solution de Pal). La R. Fe étant néanmoins positive.

D'autres auteurs, Fürst et Seyfarth (1921) entre autres, qui cherchent à contrôler les conclusions de Carbone et de Brown, confirment bientôt la présence du fer dans le Pm. En effet, si, comme le soutiennent ces derniers, le Pm offre de grandes analogies avec l'hématine, il est fort probable que, du point de vue de la chimie analytique, il doit contenir du fer.

L'originalité et l'intérêt des recherches de Seyfarth résident dans le fait qu'il étudie le Pm dans les organes de para-

lytiques généraux infectés expérimentalement avec des parasites de la fièvre tierce.

Il montre que le fer peut être libéré du Pm par une sorte de scission de la molécule, mais ne peut cependant être mis en évidence avec les réactions ferriques ordinaires qu'à la condition de faire subir au Pm certaines modifications. Il soumet pour cela les préparations à un traitement préalable par le sulfure d'ammonium (pendant douze heures environ) et obtient la réaction du bleu de Prusse. Il explique l'échec de ses prédécesseurs par le fait qu'ils ont utilisé des préparations de Pm fixées depuis plus ou moins longtemps dans le formol, ce qui suffirait à empêcher la réaction de se produire (nous verrons qu'en effet la fixation dans le formol donne lieu à la production d'un pigment noir dans les préparations).

Enfin, Seyfarth note que le Pm endoglobulaire ne donne jamais la réaction du fer, alors que celui que l'on trouve dans les phagocytes peut la donner.

Cependant un tel résultat ne suffisait pas pour affirmer la supposition de la scission du fer, si l'on ne pouvait pas donner une autre preuve de la présence du fer dans le Pm. Effectivement, par l'analyse spectroscopique du Pm, Seyfarth confirma les résultats obtenus par Carbone et Brown, à savoir que le Pm était essentiellement composé d'hématine.

Il est vraisemblable d'admettre toutefois que Seyfarth, et après lui Mayer, Stefani, Warasi, qui ont obtenu des résultats analogues, ont eu connaissance, bien qu'ils n'en fassent pas mention, de certains travaux de Retterer et de Daniels et Newham.

Retterer (3), étudiant le fer dans les hématies des mammifères, avait indiqué, en effet, que ce dernier peut être incorporé à la molécule de façon intime, dissimulé ou, selon l'expression de Molisch, « masqué », en sorte qu'il existe sous un état qui le soustrait aux réactifs ordinaires de ce métal.

(3) Retterer (Ed.), *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1916, p. 15.
GARBIÈS.

Par contre, il arrive quelquefois que le fer est en combinaison plus lâche, et sa présence peut être décelée par action du ferrocyanure de potassium et de l'acide chlorhydrique : on voit alors apparaître en certains endroits de la préparation des amas ou des grains qui se colorent en bleu. C'est cette dernière forme que Tizzoni a désignée sous le nom de fer « libre » et Retterer sous celui de « mi-masqué ». Ces deux états se trouvent selon que le fer est en combinaison plus ou moins stable avec les nucléoprotéides, et un examen peu approfondi peut ainsi laisser supposer que le fer a perdu son caractère métallique.

Pour Daniels et Newham, le fer qui se trouve en combinaison organique ne donnerait pas la réaction du fer libre.

Signalons, enfin, que des travaux de Schmidt et de Carnot ont montré qu'on ne pouvait trouver dans la réaction chimique du fer un test absolu et que la présence ou l'absence des réactions apparentes du fer dépendrait simplement du stade d'évolution du pigment.

En 1923, Mayer entreprend, pour diverses raisons, de vérifier les découvertes histochimiques de Seyfarth, car ce dernier avait envisagé que la mise en évidence du fer libéré, démontrée pour le Pm de la fièvre tierce, pourrait ne pas réussir, ou réussir moins bien avec le pigment de la fièvre quarte ou tropicale; il faisait là allusion à des observations de Golgi, selon lesquelles le Pm ne se présenterait pas sous la même forme dans les différents types de malaria.

Mayer fit ses recherches sur quatre cas authentiques de paludisme, modifiant les procédés usuels par l'emploi de la réaction de Turnbull⁽⁴⁾ et d'une solution d'alcool chlorhydrique à 2 p. 100.

Il en déduit un certain nombre d'observations :

- 1) les découvertes de Seyfarth en ce qui concerne le Pm de la fièvre tierce, sont également vraies pour celui de la fièvre tropicale;

(4) La méthode dite du bleu de Turnbull (proposée par Tirmann et Schmelzer) fait agir successivement le sulfhydrate d'ammonium et le ferrocyanure de potassium.

- 2) l'apparition de « zones bleues » tout autour des grains de pigment, obtenues par Seyfarth au moyen des R. Fe après dissociation de la molécule pigmentaire, est bien la preuve d'une séparation du fer contenu dans le Pm, et qui s'isole. Ces auréoles azurées sont dues, en effet, à la diffusion du fer libéré et dissous, et la réaction passe par des degrés variables. Il arrive même qu'il se forme des taches verdâtres ou bleues, de tonalité variée, qui démontrent directement la présence du fer dans le Pm;
- 3) tandis que le fer du Pm endocellulaire peut donner facilement la réaction, celui du Pm endoglobulaire ne peut presque jamais la donner;
- 4) le pigment formolique donne aussi une R. Fe négative avec la même technique, et cette circonstance peut être utilisée pour le diagnostic différentiel entre le pigment formolique et le Pm endocellulaire.

Lignac (1923) estime cependant qu'il est très difficile de démontrer avec certitude la présence de fer dans les grains de Pm. Pour lui, les méthodes de Brown et Seyfarth sont insuffisantes, car, dit-il, la réaction (production de bleu de Prusse et de Turnbull) doit se produire « inside », dans l'intérieur du granule pigmentaire. Ceci fut réalisé par Mayer, qu'on peut considérer comme le premier à avoir démontré avec certitude la présence de fer dans le Pm. Mais Lignac a essayé sans succès de reproduire la réaction de Mayer. Sans vouloir en discuter l'exactitude, il attire cependant l'attention sur le fait que deux des corps nécessaires à la réaction (ferrocyanure de potassium et acide chlorhydrique), si on les laisse trop longtemps au contact l'un de l'autre, peuvent donner naissance à du bleu de Prusse sans qu'il soit nécessaire pour cela qu'il y ait présence de fer étranger.

Kósa (1925) arrive aux mêmes conclusions que Mayer en ce qui concerne le Pm endocellulaire. Il note, de plus, que le Pm libre (ectoglobulaire) donne la RFe après digestion par le suc gastrique ou après séparation du fer par les acides concentrés.

Glasunow, en 1925, entreprend de nouvelles recherches histochimiques sur des coupes fixées au mélange d'Orth. Il ne peut réussir à obtenir la RFe positive, selon les méthodes de Brown et Seyfarth, après une extraction de l'hémosidérine plus poussée et estime que les résultats de ces deux auteurs ne sont pas justifiés. D'autre part, il n'admet pas que l'on puisse obtenir, ainsi que le suppose Mayer, une RFe positive par l'emploi préalable d'un acide alcoolique faible et de sulfure d'ammonium. Il faudrait pour cela que ces deux solvants, non seulement dissolvent les molécules de Pm, mais encore les décomposent avec mise en liberté du fer. Ce dernier, devenu libre, serait alors seulement à même de réagir avec le ferrocyanure de potassium. Or, pour Glasunow, la désintégration du Pm dans de telles conditions est impossible, car, dit-il, « ... il est reconnu que le sulfure d'ammonium réduit le Pm seulement au stade hémochromogène, lequel est incapable de donner les RFe habituelles... ». Des moyens plus énergiques sont nécessaires pour cela. A l'appui de cette thèse, il cite un certain nombre d'expériences personnelles.

En conséquence, si Brown, Seyfarth et Mayer ont obtenu une RFe positive, cela tient à l'extraction imparfaite de l'hémosidérine, par l'acide oxalique, point important qu'il ne faut pas perdre de vue. Pour mettre en liberté le fer du Pm, Glasunow propose un procédé jamais appliqué encore à ce pigment, mais très employé en chimie organique pour isoler l'hématine :

Küster) : la méthode d'oxydation par action de l'eau oxygénée. Il ne peut réussir néanmoins à mettre en évidence la RFe dans le Pm.

On voit par cet exposé que la recherche des RFe dans les coupes histologiques, peut-être à cause d'une technique imparfaite, n'est pas exempte d'objections et les résultats obtenus ne sont pas concluants.

b) RECHERCHE DU FER DANS LES CENDRES DU Pm.

La méthode de calcination pour déceler le fer a été employée tout d'abord par Carbone, qui trouva dans les cendres du Pm préalablement isolé un « squelette de sesquioxyde de fer ».

Brown trouve que le résidu provenant d'une solution alcaline de Pm, neutralisée par l'acide chlorhydrique et évaporée, donne des cendres contenant du fer.

Ascoli, puis Warasi, mettent également en évidence la RFe positive dans les cendres du Pm.

Ainsi il ne subsiste aucun doute sur la présence de fer dans le Pm, présence qui ne peut toutefois être mise en évidence dans les préparations qu'en modifiant les réactions ordinaires (méthode de Seyfarth), mais que l'on peut démontrer plus facilement dans les cendres du Pm.

Nous avons, par ailleurs, indiqué, à propos de l'analyse élémentaire, quelle est la proportion de fer contenue dans le Pm.

VI. — *La question de la solubilité du Pm dans le plasma.*

Rocchi (1930) a, le premier, démontré de façon indubitable une particularité du Pm d'un très grand intérêt : sa solubilité dans le plasma rendu incoagulable par l'hirudine.

Brown, en 1912, avait d'ailleurs déjà admis cette propriété comme hypothèse pour expliquer l'action pyrogène possible de l'hématine, qu'il considérait comme identique au Pm.

La raison de cette solubilité dans le plasma serait due vraisemblablement aux propriétés alcalines du Pm.

La conséquence logique de Rocchi tire de cette constatation est que « le Pm, à mesure qu'il se forme, n'entre pas dans le sang et dans le complexe humoral comme une poudre inerte, mais bien comme une substance soluble, en partie tout au moins, et vient en contact intime avec les

humeurs de l'organisme ». « Il est vrai, ajoute-t-il, que la formation d'anticorps peut aussi être provoquée par un antigène qui a été modifié ou élaboré dans le complexus cellulaire du système réticulo-endothélial, lequel est, à la fois, le siège de production d'anticorps et le lieu de localisation du Pm dans notre cas particulier. »

Mais ce sont là des inductions sans base expérimentale.

Il n'en reste pas moins qu'il semble y avoir là une confirmation indirecte du principe sur lequel sont basées les réactions de Henry, la ferrofloculation en particulier.

S'il est vrai que, pour cette dernière, l'endo-antigène est représenté par l'hémosidéline, grâce au fer qu'elle contient, le Pm, qui contient du fer lui aussi, et qui, de plus, est soluble dans le plasma, ne peut-il pas se comporter également comme endo-antigène?

Par ailleurs, on peut tirer aussi de cette propriété nouvelle du Pm des déductions d'ordre anatomo-pathologique, comme nous le verrons à propos de l'élimination du Pm.

VII. — *Nature chimique du Pm et rapports avec certains autres pigments.*

La connaissance des caractères du Pm et son étude chimique sont d'une importance fondamentale pour déterminer sa nature chimique, qui seule peut permettre de le classer rationnellement. A la constitution chimique est, d'ailleurs, subordonnée la connaissance de tous les autres problèmes biologiques.

Notons tout d'abord que le Pm répond bien à la définition générale des pigments de Verne, puisqu'il a pu être isolé et que c'est « une substance naturellement colorée élaborée dans un organisme vivant ». De plus, il entre dans la classe des pigments, dont l'édifice chimique est un noyau tétrapyrrolique à groupement métallique (ferrugineux), puisque c'est un composé pigmentaire qui se rattache à l'hémoglobine.

Si, au début, le Pm ne fut considéré que comme un déchet de l'hémoglobine ayant servi de nourriture aux parasites (Laveran, Ruge, Wiener, Manson, Mülhens, Schilling, etc.), très vite, cette conception fut abandonnée.

A la suite des recherches chimiques de Carbone, on l'identifie à l'hématine (Brown, Ascoli, Bignami, Ziemann, Plötz, Trambusti, Lustig, Galeotti, Pontano, Schaudinn). Mais, plus récemment, de nombreux auteurs (entre autres Seyfarth, Kósa, et, avant eux, Dionisi) ont émis l'idée que si le Pm était assez semblable à l'hématine, il ne s'identifiait pas absolument avec elle, et pour Warasi il se rapprocherait même plus qu'on ne le pense de la mélanine ferrugineuse. Pour les uns, il serait une hématine transformée, pour d'autres, certaines substances d'origine plasmodiale entreraient dans sa composition.

C'est ainsi que, pour Sakharoff, l'adjonction de la substance nucléique du parasite à l'hémoglobine est nécessaire pour faire apparaître le Pm; et, pour Danilewsky, il se formerait dans les hématozoaires aux dépens de la paranucléine.

Verne considère le Pm comme un corps plus complexe que l'hématine; ce serait plutôt une parahématine ou un noyau azoté est lié à l'hématine.

Kósa, en se basant sur l'analyse spectroscopique et les propriétés chimiques (solubilité, RFe), distingue, d'une part, le Pm endo et ectoglobulaire, qui, selon lui, serait de même nature que l'hématine (en particulier que l'hématine peptique de Zeyneks), et, d'autre part, le Pm endocellulaire, dont une partie a les propriétés de l'hémosidérine, et une autre, la plus grande, se rapproche de l'hématine.

Ainsi, comme on peut facilement s'en rendre compte en étudiant les travaux des différents auteurs, le Pm, sans être une hématine pure, s'en rapproche beaucoup. Mais comme en chimie physiologique on distingue plusieurs espèces d'hématine, il est difficile de dire à laquelle appartient le Pm. Il paraît vraisemblable toutefois de le ranger « parmi les héma-

tines de digestion, dont une des propriétés est de former très facilement sous l'action de l'acide chlorhydrique concentré des cristaux d'hémine » (Glasunow).

En résumé, les caractères qui séparent le Pm de l'hématine sont sa formule élémentaire un peu différente et le fait que la quantité de Pm élaboré par un hématozoaire est plus importante que la quantité d'hématine que peut fournir l'hémoglobine d'un globule rouge parasité. Par contre, les propriétés chimiques et spectroscopiques du Pm sont analogues à celle de l'hématine. De plus, on a pu obtenir des cristaux typiques de Teichmann (hémine) à partir du Pm extrait de la rate par la potasse alcoolique à 0,04 p 1.00 (Glasunow). Enfin reste l'étroite parenté qui existe entre le Pm et le pigment formolé qui se forme dans les pièces contenant de l'hémoglobine et conservées dans le formol ou qu'on obtient artificiellement, pigment qui paraît devoir être rangé dans la classe des hématines formées par un fixateur.

Il nous reste à passer brièvement en revue quelques variétés chimiques de pigments voisins du Pm pour montrer les caractères qui les séparent (pigment ocre, mélanines) ou qui les rapprochent (pigment formolé, hématine) du Pm.

Le PIGMENT FERRUGINEUX, encore connu sous les noms de PIGMENT OCRE, d'HÉMOSIDÉRINE et de RUBIGINE, résulte de la désintégration de l'hémoglobine. Il se présente sous forme de granulations inégales, à arêtes anguleuses, isolées ou groupées en petits amas irréguliers et plus ou moins compacts. Sa couleur varie du jaune au rouge brun. On le rencontre dans l'organisme au cours de toutes les affections dans lesquelles il y a destruction importante et rapide des globules rouges : c'est ainsi qu'il voisine avec le Pm dans le paludisme, sans cependant être spécial à cette affection.

Il est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, et résiste aux alcalis étendus et aux acides organiques. Il est soluble, quoique difficilement, dans les acides minéraux étendus et dans l'alcool acide. Enfin la présence de fer peut y être directement et facilement mise

en évidence par les réactions histochimiques ordinaires (réaction du bleu de Prusse de Perls et réaction du sulfhydrate d'ammonium); il ne se colore pas par les couleurs basiques d'aniline. Sa nature chimique l'apparente à l'hydrate ferrique et il se transformerait en pigments biliaires.

Il ne séjourne pas dans le système circulatoire et on le rencontre principalement dans le foie, où il débute par l'apparition de leucocytes chargés de pigment dans les capillaires intrahépatiques. puis dans les cellules de Kupffer, et enfin dans l'intérieur des cellules hépatiques. Dans la rate, on le trouve surtout dans la pulpe, inclus dans les cellules et dans les corpuscules. On le rencontre, enfin, dans les cellules épithéliales des tubes contournés et dans leur lumière, en même temps que dans la capsule de Bowman et lymphatiques, la moelle osseuse; il est rare à l'intérieur des vaisseaux cérébraux.

Il se différencie donc du Pm par sa répartition et par ses caractères physico-chimiques.

Le PIGMENT MÉLANIQUE proprement dit est un produit de désintégration des protéiques. En réalité, l'unité de ce pigment n'est nullement démontrée, et il y a *des mélanines* dont la constitution varie selon la provenance. On rencontre cette série de pigments dans les tumeurs mélaniques, et c'est à eux que sont dues les colorations noires (peau, poils, choroïde, etc.). C'est le type des pigments intracellulaires. Les mélanines se présentent sous forme de petites granulations rondes, de couleur noire ou brun noir. Elles n'envahissent le sang que secondairement et de façon transitoire.

Sur les coupes, elles sont décolorées, quoique difficilement, par l'eau oxygénée, et un peu plus rapidement par le permanganate de potassium. Chimiquement très résistantes, les mélanines sont : insolubles dans l'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme, les acides même concentrés, les alcalis étendus (potasse à 0,20 p. 100 et ammoniacque), les solutions saturées de carbonate de lithium, l'acide chlorhydrique en solution alcoolique et étherée; solubles dans les alcalis concentrés et quelquefois, suivant la provenance,

dans le sulfhydrate d'ammonium; un peu solubles dans l'alcool absolu, la pyridine, le sérum; elles ne sont pas modifiées par le formol et les oxydants énergiques. Elles sont douées de propriétés réductrices vis-à-vis du nitrate d'argent et de l'acide osmique. Elles contiennent des traces de fer, mais ne paraissent pas donner les réactions caractéristiques ordinaires de ce dernier. On y trouve également du soufre en proportions variables et quelquefois élevées et du phosphore en petites quantités. La composition chimique centésimale varie d'ailleurs selon la provenance. Elles ne se colorent pas par le Ziehl et donnent une coloration vert émeraude avec le bleu polychrome. On peut les obtenir artificiellement à partir de la dioxypénylalanine (dopa), mais rien ne permet de déduire que ce sont des composés pyrroliques. Si certains auteurs ont prétendu que les mélanines tirent leur origine de l'hémoglobine, cette théorie est généralement abandonnée, et, à l'heure actuelle, c'est la théorie fermentative de la mélanogénèse qui est admise.

Ces quelques notions générales suffisent amplement pour montrer les différences essentielles qui séparent les mélanines du Pm.

Le PIGMENT FORMOLÉ, que l'on désigne encore quelquefois sous les noms de PIGMENT DU FORMOL OU PIGMENT NOIR HÉMOGLOBINIQUE, est un pigment qui apparaît dans les tissus fixés par le formol sous forme de granulations noires, amorphes ou cristallisées, sur lesquelles les réactifs ordinaires ont peu d'action. D'origine hématiche, il est plus abondant là où il y a du sang ou dans le voisinage immédiat de celui-ci. La plupart des auteurs le considèrent comme une transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine ou éventuellement en hématine acide (Browicz, Takayama, Hueck, Minakow, Puppe, Heile, Haurowitz, Glasunow). D'ailleurs, il est possible d'obtenir in vitro ce pigment à partir de l'hémoglobine du sang, et Vernoni, en 1925, a obtenu un pigment noir semblable par action du formol sur un dérivé coloré hémoglobinique privé de fer : l'hématoporphyrine.

Très résistant vis-à-vis des réactifs, la confusion est possible avec le Pm, car leurs propriétés histochimiques sont étrangement

identiques. Insoluble dans l'acide sulfurique concentré et les acides étendus, dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, il est soluble dans les alcalis étendus et alcooliques et le sulfure d'ammonium. Il n'est pas modifié par le ferrocyanure de potassium et la RFe est négative : c'est là, pour Mayer, un moyen de diagnostic différentiel vis-à-vis du Pm, mais qui, pour Glasunow, n'a qu'une « valeur relative ».

Les recherches de Vernoni montrent que des pigments semblables au Pm peuvent être facilement obtenus à partir de l'hémoglobine en mettant en œuvre des milieux artificiels très semblables à ceux qu'un organisme vivant peut réaliser, et que l'hémoglobine peut produire des dérivés à caractère pigmentaire granuleux.

Des propriétés histochimiques et spectroscopiques et de la structure chimique, il ressort que le pigment formolé et le Pm sont vraisemblablement très proches, s'ils ne sont pas tout à fait identiques. Néanmoins nous avons vu par ailleurs comment la recherche de la RFe pouvait permettre de différencier le pigment formolé du Pm endocellulaire, et, d'autre part, les caractères généraux et la distribution du pigment formolé, qui occupe une situation complètement arbitraire et ne garde pas de relation avec les éléments différenciés, permettent également une distinction facile.

La conclusion pratique, c'est que, pour l'étude du Pm, les tissus fixés avec le formol, que Ewing et Brown ont utilisés, ne doivent jamais être employés sous peine d'erreur.

Le terme d'HÉMATINE sert à désigner toute une série de pigments plus ou moins semblables, dérivés de l'hémoglobine. *In vitro* on connaît, d'une part, le composé prosthétique coloré ferrugineux (hématine proprement dite), résultant de la décomposition de l'hémoglobine sous l'influence de la chaleur ou d'un acide avec mise en liberté de globine, et, d'autre part, à côté de nombreuses parahématines, le produit de transformation de l'hémoglobine, sous l'influence des liquides conservateurs, que l'on trouve dans les

pièces histologiques. *In vivo* se rencontre l'hématine, qui se forme par action des sucs digestifs sur le sang (hématine peptique). Cette dernière se distingue des précédentes par la propriété de donner plus facilement des cristaux de Teichmann ⁽⁵⁾.

L'hématine se présente sous forme d'une poudre amorphe de couleur noir bleuâtre ou brun noir avec une teinte violacée.

Soluble dans les alcalis faibles et plus ou moins soluble dans l'alcool-acidifié et les acides concentrés, l'hématine est insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther et les acides dilués. Elle est transformée en hémochromogène par le sulfure d'ammonium. Le fer qu'elle contient est masqué et la réaction de Perls est négative avec le procédé ordinaire; elle est dépourvue de soufre.

En milieu acide, son spectre est caractéristique et ressemble à celui de la méthémoglobine; il comprend quatre bandes d'absorption : deux entre D et F, une, *large et très nette, entre C et D*, et une vers λ 494. En milieu alcalin, on trouve une large bande sur D avec forte absorption à droite à partir du vert et deux bandes sur λ 434 et 394. Sa formule serait, pour Küster, $C^{34}H^{34}N^4FeO^5$, et, pour Nencki et Sieber : $C^{32}H^{32}N^4FeO^4$; l'hématine contient donc un noyau pyrrolique.

(5) Par action d'un acide et du chlorure de sodium sur du sang, on obtient à chaud des cristaux de Teichmann (hémine), qui, sous l'action des alcalis, donnent l'hématine.

CHAPITRE IV

DISTRIBUTION DU Pm DANS L'ORGANISME

I. — *Le Pm dans les hématozoaires.*

On sait que le plasmodium, qui se développe pendant l'apyrexie dans le corps du globule rouge, en transforme l'hémoglobine et se charge de Pm, qui, peu de temps avant l'accès, se rassemble au centre du parasite. Il passe dans le sang une fois le stade de sporulation achevé, libéré par l'éclatement du corps en rosace.

C'est à Schaudinn que l'on doit la remarquable étude de la formation du Pm et de son évolution chez les différents types de plasmodiums. Les observations de cet auteur sont rapportées par Grall et Clarac dans leur *Traité de pathologie exotique*.

On peut observer dans le protoplasma du parasite les grains de Pm, soit divisés finement, soit en bâtonnets et leur coloration est brun noirâtre et de reflet verdâtre. Toutefois la forme, les dimensions, la couleur du Pm, varient selon les plasmodiums considérés et la période du cycle d'évolution pendant laquelle on l'observe (Schaudinn, Swellengrebel, Mühlens, Ziemann). Ces différences sont surtout facilement constatables dans les macrogamètes et les microgamétocytes.

D'une façon générale, les grains, qui sont fins au début de la vie parasitaire, grossissent ensuite de plus en plus.

Dans la fièvre quarte (*Pl. malariae*) le Pm des schizontes est immobile, volumineux, en forme de bâtonnets et de colo-

ration brun foncé ou noir. Il se rassemble vers le centre en amas. Dans les gamètes les caractères sont les mêmes que pour la fièvre tierce bénigne.

Dans la fièvre tierce bénigne (*Pl. vivax*) le Pm des schizontes se présente toujours sous forme de fins granules assez nombreux dont la couleur est jaune brun. Dans les macrogamètes et les microgamétocytes, le Pm est plus abondant, en grains plus volumineux que dans les schizontes et doué d'une mobilité qui diminue progressivement. Dans la fièvre tierce maligne ou tropicale (*Pl. falciparum*), les granulations sont beaucoup moins abondantes que dans les autres formes; à peine trouve-t-on dans les schizontes quelques grains de Pm de coloration brune, qui se rassemblent au centre ou quelquefois à la périphérie. Dans les macrogamètes, le Pm est réuni au centre, en couronne, et masque plus ou moins le noyau; celui des microgamétocytes est disséminé aux deux pôles.

Ainsi l'apparition du Pm est plus précoce dans le *Pl. vivax*; par contre, le *Pl. malariae* produit des grains plus gros et moins nombreux et la couleur en est plus sombre. C'est le *Pl. falciparum* qui fournit le moins de pigment. Signalons, enfin, que la quantité de Pm dépend également de l'espèce de plasmodie, ainsi que l'a fort bien montré Warasi : bien plus abondant dans le *Pl. malariae* que dans le *Pl. vivax*, et moins abondant dans le *Pl. precox* (*haemaeba immaculata*).

II. — Le Pm dans les divers organes.

EXAMEN HISTO-PATHOLOGIQUE.

1) Altération du sang.

Le Pm apparaît dans le sang au cours de l'accès fébrile, et disparaît assez rapidement après la terminaison de la fièvre. On peut le rencontrer alors soit libre, soit inclus dans les leucocytes « mélanifères ».

Libre, il se présente sous forme de petits grains arrondis ou plus ou moins irréguliers de $1\ \mu$ de diamètre au plus, parfois réunis en amas; sa couleur varie du brun au noir foncé. Mais, le plus fréquemment, il est inclus dans les leucocytes dits pigmentés. On rapporte d'ordinaire les leucocytes renfermant le Pm aux monocytes. Mais Stefko et Botchkareff⁽¹⁾ écrivent que « ... presque toujours on observe le pigment inclus dans les formes binucléaires des leucocytes, rarement dans les grands mononucléaires, et jamais dans les lymphocytes. » Ce sont, en effet, surtout les polynucléaires qui sont mélanifères, et le Pm est renfermé dans leur protoplasma soit sous forme de particules ou de petits bâtonnets isolés ou, le plus souvent, sous forme de granulations extrêmement fines, qui imbibent tout le plasma et lui donnent une couleur brunâtre. Toutefois, la présence de macrophages pigmentés dans la circulation est fugace (Marchoux). Enfin, on trouve aussi le Pm dans les cellules endothéliales desquamées des parois vasculaires et dans l'endothélium des vaisseaux.

Les sièges d'élection sont les petits vaisseaux et le sang de la grande circulation, en particulier celui de la veine splénique; c'est, d'ailleurs, en se massant dans les capillaires des organes qu'il communique à ceux-ci leur teinte ardoisée caractéristique.

Il faut noter cependant que c'est peut-être par voie lymphatique aussi bien que par voie sanguine que le Pm est transporté.

2) *Lésions viscérales.* ...

PALUDISME AIGU (*accès pernicieux*). — Le Pm est transporté dans les organes par les leucocytes mélanifères, mais il peut également se former *in situ* par dépôt de parasites dans les viscères durant une partie du cycle évolutif. Les lieux d'élection de la localisation pigmentaire sont la rate, le foie, la

(1) Stefko (W.-G.) et P.-V. Botchkareff, *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, n° 8, oct. 1924, p. 631-637.

moelle osseuse et l'encéphale, où la circulation capillaire est plus lente.

Dans la rate et la veine splénique, le Pm s'accumule en quantité variable, mais c'est surtout dans le sang des branches de la veine splénique qu'on trouve des cellules mélanifères, et sur des coupes microscopiques de la rate dans les sinus veineux. Le Pm est ici surtout intracellulaire et il est phagocyté par les grandes cellules réticulo-endothéliales de la rate.

Il se localise presque exclusivement dans la pulpe rouge (Mosto), où il forme des amas séparés par des espaces à pigmentation moindre; parfois, mais rarement, on le trouve dans l'endothélium des vaisseaux et des capillaires et il ne pénètre pas, en général, dans l'intérieur des follicules de Malpighi. Il peut cependant s'accumuler à la périphérie du follicule, formant une sorte d'anneau (mélanose périfolliculaire de Marchiasava). La même disposition peut se retrouver aussi autour et le long des faisceaux conjonctifs hyperplasiques.

Dans le foie, on trouve les cellules mélanifères, surtout dans les capillaires sanguins, dont elles obstruent parfois la lumière; abondantes dans le sang de la veine porte, on ne les retrouve plus dans celui de la veine sus-hépatique : elles semblent être retenues par le foie comme par un filtre.

Le Pm est uniformément distribué dans le réseau capillaire des lobules et il infiltre les parois des vaisseaux et les travées conjonctives de la capsule de Glisson. On ne le trouve jamais dans les cellules hépatiques (Kelsch et Kiener) ni dans le tissu conjonctif, mais seulement dans les cellules de Kupffer (Bignami, Klotz), dans l'endothélium des vaisseaux et dans les cellules des espaces conjonctifs.

Dans le rein, on trouve le Pm, surtout dans la zone corticale et dans l'endothélium des capillaires. L'infiltration pigmentaire siège spécialement dans les tubes contournés, dont la lumière peut même être obstruée, et en moindre quantité dans les tubes droits. De plus, la présence d'éléments pig-

mentés est encore visible, surtout au niveau des capillaires et des cellules de l'endothélium des glomérules de Malpighi (Pringault), et ils arrivent parfois à remplir la capsule de Bowmann.

La moelle osseuse est très riche en Pm, que l'on trouve presque exclusivement dans les leucocytes, aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des vaisseaux (Kabelik).

Dans le cerveau, le Pm, en se massant dans la lumière des artérioles de la substance grise, donne à cet organe sa coloration brunâtre caractéristique; mais la plus grande partie du Pm est encore dans les parasites intraglobulaires agglomérés dans les petits vaisseaux et les capillaires (Bareau, thèse Bordeaux, 1931-1932), bien qu'on puisse en trouver aussi dans l'intérieur des globules blancs et libre.

Dans les ganglions lymphatiques, où le Pm est finalement transporté et peut-être détruit (hypothèse à l'appui de laquelle Kelsch a montré que les ganglions du hile du foie sont toujours très pigmentés chez les vieux paludéens), on le trouve disséminé principalement dans les follicules de la substance corticale, où il paraît être amené par les vaisseaux lymphatiques.

Dans tous les autres organes, on trouve toujours le Pm dans les capillaires sous forme de leucocytes pigmentaires.

En résumé, si certains organes ne retiennent le Pm que de façon transitoire (il est alors toujours intravasculaire), d'autres l'arrêtent de façon durable et l'incorporent dans leurs éléments propres.

PALUDISME CHRONIQUE. — On retrouve les éléments pigmentés dans la veine splénique, en dehors des vaisseaux, et quelquefois dans les cellules du tissu conjonctif de la rate.

Dans le foie, le Pm se rencontre dans les capillaires, dans les cellules hépatiques (périphérie des lobules et autour des espaces portes) et dans le tissu conjonctif périvasculaire (espaces lymphatiques).

Il fait presque complètement défaut dans la moelle osseuse, qui s'en débarrasse beaucoup plus rapidement que la rate.

III. — *Le Pm dans la peau : teinte des paludéens.*

La coloration terreuse et diffuse si particulière de la peau des paludéens, que l'on trouve surtout dans les formes chroniques et dans la cachexie palustre, fait, en quelque sorte, partie du tableau symptomatique. Dans la plupart des traités classiques sur le paludisme (Mannaberg, Ruge, Marchiasava et Bignami, Ascoli, etc.), cette mélanodermie palustre est brièvement mentionnée.

Griesinger et Colin ⁽²⁾ avaient admis que la présence d'éléments pigmentés dans le derme expliquait cette teinte.

Darier ⁽³⁾ écrit que le Pm est « ... apporté en nature par le courant sanguin et déposé dans le derme et les papilles, au voisinage des vaisseaux ».

En 1921, Jona ⁽⁴⁾, s'est élevé contre cette conception et a repris l'étude de ce phénomène en utilisant des examens diascopiques et histologiques de la peau. Il croit pouvoir affirmer que le Pm « ne se fixe pas dans la peau », et pour lui la teinte de la peau des paludéens n'a rien de spécifique et est sous la dépendance, entre autres facteurs, de l'appauvrissement du sang en hématies et en hémoglobine.

Capuani ⁽⁵⁾ qui a adopté ce même point de vue, fait, de plus, jouer un rôle à l'hyposurrénalisme aigu.

(2) Colin (L.), *Archives générales de médecine*, 1875, t. II, p. 644.

(3) Darier (J.), *La Pratique dermatologique*, 1902, t. 3, article « Mélanodermies », p. 436 et 476.

(4) Jona (G.), *La tinta dei malarici. Il Policlinico sez-pratica*, Roma, fasc. 29, 1921, p. 971-976, et fasc. 39, sept. 1921, p. 1301).

(5) Capuani (G. Fr.), *A proposito della tinta dei malarici. Il Policlinico sez-pratica*, fasc. 36, sept 1921, p. 1203-1206.

Capuani (G. Fr.) et Jona (G.), *Il Policlinico sez-pratica*, fasc. 46, nov. 1921, p. 1351-1353.

CHAPITRE V

ORIGINE, MODE DE FORMATION ET DESTINÉE DU Pm

I. — *Genèse.*

Si l'élaboration du Pm par l'hématozoaire aux dépens de l'hémoglobine des hématies parasitées ne fait aucun doute, on ne connaît pas, à vrai dire, quelle en est la genèse intime et quelles sont les transformations subies par l'hémoglobine. Sur ce point, on en est réduit à des hypothèses.

Pour Dionisi, comme pour Seyfarth d'ailleurs, l'hématozoaire scinderait l'hémoglobine durant sa digestion en sécrétant des substances lytiques, et, après avoir utilisé les parties utiles pour sa nutrition, telles que la globine, abandonnerait les déchets de l'hémoglobine, entre autres l'hémochromogène, qui se transformeraient en Pm.

C'est également une idée analogue que soutient Bignami quand il dit que « le parasite se nourrit en soutirant de la molécule complexe de l'hémoglobine la partie albuminoïde et laisse inutilisée la partie pigmentaire », c'est-à-dire l'hématine.

Ascoli, par contre, n'admet pas que le Pm soit le produit de déchet de l'aliment retiré par l'hématozoaire et pense que le « ... pigment représente la fixation de l'hémoglobine sur les parties différenciées du parasite (nucléoses) capables de la transformer en hématine ».

Brown s'est attaché tout particulièrement à déterminer le mode de formation du Pm et, par analogie avec ce qui

se passe chez de nombreux protozoaires, pense que le Pm doit provenir d'une transformation de l'hémoglobine sous l'action d'une « enzyme protéolytique » spéciale, secrétée par le plasmodium et analogue dans son action à la pepsine et à la trypsine. Par un tel processus, l'hémoglobine serait scindée en une protéine utilisée par le parasite et en hématine d'où dériverait le Pm.

Ruge et James se rangent à cette opinion.

Comes croit que les *Pl vivax* et *malariae* assument leur nutrition, comme font les amibes, dans une vacuole nutritive, et il en donne pour preuve le fait que le Pm apparaît tout d'abord dans le voisinage immédiat de la vacuole. Le Pm serait ainsi un produit de transformation des substances nucléaires des plasmodies. Chez le *Pl. præcox*, le noyau produirait le pigment directement et sans l'intermédiaire de la vacuole nutritive.

Cette conception est, en partie, confirmée par certaines observations de Warasi ⁽¹⁾, qui a montré que l'hémoglobine n'était jamais présente dans la vacuole du parasite et que ce dernier, en entrant dans un globule rouge, s'enveloppe d'une membrane qui l'isole de l'hémoglobine.

Ainsi le Pm ne serait pas un simple résidu alimentaire, un produit d'excrétion apparaissant dans le protoplasma. Cette opinion est confirmée, d'ailleurs, par le fait que la quantité de Pm contenue dans les parasites n'est pas en rapport avec la teneur en hémoglobine de l'hématie.

En effet, le parasite de la fièvre quarte déshémoglobinise les globules rouges moins fortement que celui de la tierce, au même stade de développement (Müulhens), et pourtant produit une plus grande quantité de Pm. D'autre part, d'après Warasi, l'hémoglobine contenue dans une hématie normale ⁽²⁾ peut fournir théoriquement, au maximum, un

(1) Warasi (W.), *Zur Biologie des malaria parasiten* (Arch. f. schiffs. u. Trop. Hyg., 1932, Bd XXXVI, n° 8, p. 423-429).

(2) L'hémoglobine *in vivo* renferme 1,4 p. 100 d'hématine.

volume de $1,1 \mu^3$ d'hématine, et cependant le parasite produit une quantité de Pm beaucoup plus grande que celle que peut donner en hématine un globule rouge (d'après les calculs de Warasi, les parasites de la fièvre tierce produisent un minimum de $7,37 \mu^3$ de Pm, en moyenne, et les gamètes de la fièvre tropicale une moyenne de $17,37 \mu^3$). Comme, d'autre part, il est démontré que le Pm n'absorbe pas d'eau et que, par suite, son volume ne varie pas, on doit admettre que les plasmodiums n'élaborent pas leur Pm uniquement avec l'hémoglobine des hématies, mais qu'ils le tirent également de substances propres déjà assimilées ou qui font partie intégrante de leur corps.

Toutes ces hypothèses, si séduisantes soient-elles, n'apportent cependant pas beaucoup de lumière, et, si la formation du Pm sous l'influence d'une action digestive et par destruction de l'hémoglobine est très vraisemblable, c'est un point qui, malgré tout, reste encore bien obscur.

II. — *Elimination.*

Le sort ultime du Pm déposé dans les organes est également mal connu. A mesure que s'espacent les accès, les dépôts de Pm deviennent moins importants mais, une fois l'infection malarique éteinte, il demeure cependant encore, pendant des mois et des années, dans les organes (Seyfarth l'a retrouvé deux ans après le dernier accès palustre), la rate en particulier, et, à cette période, il se trouve alors inclus dans le stroma fibreux. Ceci montre clairement que l'organisme éprouve beaucoup de difficulté à s'en débarrasser et qu'il ne possède pas des moyens d'élimination rapides.

Pour Marchiafava et Bignami, la durée du processus de résorption serait de trois ou quatre mois, et ils supposent que le Pm serait, en partie, transformé et détruit pendant son transport par les leucocytes, grâce à une activité digestive cellulaire.

Helly voit dans le groupement du Pm en gros amas une étape préparatoire à sa disparition. ^

Mülhens soutient que c'est dans les cellules du tissu conjonctif que se détruisent, « par démolition », les parasites et le Pm.

Dionisi et Sëyfarth pensent que le Pm est assez rapidement détruit et éliminé, en partie tout au moins, sans pouvoir expliquer par quel processus.

Pour Kósa, le Pm disparaîtrait avec le temps de l'organisme et se transformerait en un corps qui se rapproche de l'hémossidéline. Signalons, enfin, que certains auteurs ont émis l'hypothèse que, peut-être, le Pm serait transformé en pigments biliaires par le foie et que la sécrétion biliaire serait ainsi une des voies principales d'élimination; confirmation de ce fait n'a pu être donnée, et il paraît peu probable que le mode d'élimination par voie digestive entre en jeu.

L'élimination du Pm par l'urine, soutenue par Urriola, a été mise en doute par Sinton, Mars et Salvatore.

Peut-être l'élimination par voie lymphatique, déjà entrevue par Arnstein, intervient-elle pour une part dans la destinée du Pm puisqu'on retrouve celui-ci dans la tunique externe des artères, les interstices du tissu conjonctif, la capsule de Glisson et les ganglions lymphatiques du hile du foie.

Quoi qu'il en soit, il n'est pas douteux que, dans le mécanisme de sa démolition comme dans son élaboration, doit intervenir, ainsi que l'ont soutenu Marchiafava et Bignami, une activité cellulaire complexe, et il paraît vraisemblable d'admettre que la solubilité du Pm dans le plasma sanguin, démontrée par Rocchi, est un des modes les plus importants d'élimination du Pm.

CHAPITRE VI

ROLE BIOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU Pm

I. — *Valeur pathogène.*

Du point de vue pathologique, on peut se demander si, en raison de son abondance et de sa localisation, le Pm ne trouble pas la fonction des organes dans lesquels il se dépose et dans quelle mesure.

Frerichs attribuait au Pm les troubles cérébraux, rénaux, hépatiques et même cachectiques des fièvres intermittentes, et Griesinger voyait dans l'accumulation du Pm dans les capillaires du cerveau la cause principale des accidents cérébraux que l'on observe au cours des fièvres palustres graves.

Charcot (1), en 1857, s'est élevé contre l'hypothèse que la présence du Pm dans le sang pouvait expliquer à elle seule tous les accidents pernicioeux, et il montre que l'importance clinique qu'on lui accorde est exagérée. Si, dans certains cas, en effet, on peut admettre que l'obstruction des vaisseaux capillaires du cerveau par le Pm entre pour une part dans la production de quelques accidents cérébraux des fièvres palustres graves, il n'y a cependant pas toujours corrélation entre ces deux manifestations.

Niemeyer (1869) (2), Colin (1870) et Ball (1873) s'expriment dans le même sens.

(1) Charcot, *Gazette hebdomadaire de médecine et de chirurgie*, Paris, 1857, p. 663.

(2) Niemeyer (F. de), *Path. int.*, 1869, trad. franç., Paris, t. I, p. 731.

Durk a prétendu que les cellules mélanifères ne bloquent jamais la lumière des capillaires et sont incapables de produire des thromboses.

A un autre point de vue, Brown a essayé de mettre en valeur le rôle pathogène possible du Pm, et, dans une série d'expériences sur le lapin, a montré que, si l'on injecte dans les veines une certaine dose d'hématine alcaline, on provoque des modifications sanguines et certaines manifestations cliniques, qu'il rapproche de celles qui se produisent chez l'homme au cours de l'accès pernicieux du paludisme. Cette analogie lui paraît d'autant plus remarquable du fait qu'il considère que l'hématine et le Pm sont chimiquement identiques. Sans vouloir juger de la valeur de ces expériences, il nous paraît cependant difficile de ne pas admettre que, dans le mécanisme de l'accès palustre, le Pm libéré dans le sang lors de l'éclatement des corps en rosace, puisse jouer un rôle dans la brusque perturbation apportée à l'équilibre physique du plasma sanguin, tout comme les corps colloïdaux hétérogènes représentés par les mérozoïtes.

Tout récemment, enfin, Lévy-Valensi et Montpellier ont pensé que le « ... véritable blocage du système réticulo-endothélial par le Pm, tout à fait analogue à ce qu'on observe dans les blocages expérimentaux », n'est pas un phénomène secondaire, et présente un intérêt physiopathologique qui n'est pas négligeable. Ils attribuent à cette altération du système réticulo-endothélial des effets mécaniques (accidents graves et pernicieux du paludisme viscéral et, en particulier, de la malaria cérébrale) et pensent qu'elle rend compte de certains caractères cliniques et hématologiques du paludisme, ainsi d'ailleurs que des modifications chimiques du sang qu'on peut y observer.

Le Pm semble donc jouer un grand rôle dans la pathogénie des accès pernicieux et de certains accidents du paludisme.

II. — *Valeur sémiologique.*

La présence du Pm dans le sang, soit dans les hématozoaires, soit dans les leucocytes, est une manifestation *sinon constante* (absence de *Pl præcox* dans le sang périphérique, absence de Pm dans les leucocytes au cours des infections moyennes), du moins *caractéristique* des fièvres paludéennes. Sous les réserves précédentes, on le retrouve dans toutes les périodes et dans toutes les formes de la malaria, comme l'ont montré dans leurs travaux Kelsch et Kiener, et comme le confirment les données anatomo-pathologiques. C'est aussi une manifestation *exclusive* du paludisme, que l'on ne retrouve, dans le sang du moins, dans aucune autre maladie en dehors de cette affection. On sait cependant que les bilharzies engendrent un pigment noir qui imprègne les cellules réticulo-endothéliales, celles du foie en particulier. Ce pigment, qui n'est autre que du sang digéré, rejeté dans les vaisseaux, puis phagocyté, peut prêter à confusion avec le Pm (Lutz) (3).

III. — *Valeur pronostique.*

Frerichs tirait de la présence du Pm dans le sang un pronostic grave, mais on a vu que son domaine clinique a été réduit à sa juste valeur par Charcot et Niemeyer. S'il est vrai que l'intensité et la persistance de la mélanémie est en raison directe de l'intensité et de la fréquence des accès, on ne peut cependant pas attribuer une grosse valeur à ce facteur, négligeable en pratique vis-à-vis de l'importance de l'espèce parasitaire en cause et du terrain.

(3) Lutz, *Mem. Inst. Osw. Cruz*, XI, 1919, p. 137 et 151.

IV. — *Valeur diagnostique.*

A. — *Le Pm dans le sang.*

Risquezt (4), en 1893, a préconisé comme moyen de diagnostic facile et sûr du paludisme, en particulier lorsque la recherche du parasite a été négative, la recherche du Pm dans le sang, appelée *signe de Risquez*.

La technique employée est celle déjà recommandée par Kelsch, et consiste à recueillir une goutte de sang au doigt du malade, comme pour une numération globulaire, qu'on dilue dans une petite quantité de sérum physiologique; on étale en mince couche sur une lame et l'on fait l'examen sous immersion. En cas de doute sur la nature des granulations, un moyen de contrôle consiste à introduire par capillarité entre la lame et la lamelle une goutte d'acide sulfurique à 20 p. 100 qui ne laisse intact que le Pm intracellulaire et le rend bien visible ou une goutte de sulphydrate d'ammonium qui détruit le Pm, laissant le reste intact.

En 1926, Pinéda (5) est arrivé aux mêmes conclusions que Risquez et Urriola, à savoir que :

- 1° dans toutes les manifestations du paludisme, on trouve le Pm dans le sang;
- 2° la quantité de Pm est en relation avec l'acuité et la gravité de l'infection palustre;
- 3° la présence du Pm persiste pendant un temps variable, dépendant de l'abondance de la mélanémie et du pouvoir de destruction ou d'élimination de l'organisme;

(4) Risquez (F.-A.), *Transactions of the 1st Panamerican Medical Congress*, Washington, août 1893, vol. 1, et *Gac. Medic. de Caracas*, déc. 1893, p. 47 et mars 1923.

(5) Pinéda (A.), *Etude du pigment mélanique dans le sang*, thèse de doctorat, sept. 1926.

4° en dehors du paludisme, on ne rencontre dans aucune autre affection le Pm dans le sang.

Ces conclusions se rapportent non seulement aux cas où l'on rencontre dans le sang le Pm et l'hématozoaire, mais aussi à ceux où ce dernier ne peut être mis en évidence, la présence du Pm affirmant alors le diagnostic de paludisme.

Risqueux considère une telle méthode comme plus rapide, plus facile et plus sûre, ajoute-t-il, que la recherche de l'hématozoaire, qui exige une technique spéciale.

Pour lui, la présence du Pm dans le sang permet de certifier que l'infection existe, latente ou visible.

Sans vouloir nous attarder sur cette question, il nous semble difficile de pouvoir affirmer sans contestation possible l'origine malarique du pigment, puisque, chez un grand nombre de malades observés par Risquez et Pineda, il n'y avait pas de parasites dans le sang.

B. — *Le Pm dans l'urine.*

Dès 1860 Oppolzer avait noté dans l'urine des paludéens la présence fréquente de pigment, tantôt libre, tantôt inclus dans les cylindres.

En 1911, Urriola, partant du fait, exprimé par Laveran, que « les éléments parasitaires ne se trouvent pas à l'état permanent dans le sang des paludiques et qu'ils peuvent disparaître temporairement », cherche un procédé de diagnostic plus sûr, qui soit basé sur un caractère qui ne manque jamais et qui n'existe que dans le paludisme : la présence constante du Pm dans le plasma sanguin et dans l'urine. Pour Urriola, en effet, le rein serait le « ... principal émonctoire du Pm, et c'est dans l'urine, ajoute-t-il, qu'il est le plus facile de constater sur le vivant sa présence ».

Les techniques qu'il emploie sont les suivantes :

a) Pour la recherche du Pm dans le plasma sanguin, on

recueille quelques gouttes de sang dans un petit tube que l'on remplit de sérum physiologique. Après cinq minutes de centrifugation, on examine au microscope une goutte prélevée au fond du tube.

b) Pour la recherche du Pm dans l'urine (*méthode d'Urriola*), on recueille l'urine dans un tube qui est agité et centrifugé pendant cinq minutes; on examine sous immersion et à un fort grossissement une goutte prélevée à la partie inférieure du culot.

Plusieurs examens sont cependant nécessaires avant de conclure à l'absence de Pm. Ce procédé de diagnostic du paludisme en l'absence de parasites dans le sang périphérique par la recherche du Pm dans l'urine, encore appelé « *signe de Urriola* », n'est d'ailleurs pas sans analogie avec celui préconisé par Risquez pour le Pm dans le sang.

Dans ses recherches, Urriola a rencontré le Pm dans l'urine et le plasma sanguin des paludéens sous quatre formes différentes, et il conclut que deux signes sont pathognomoniques du paludisme : la présence de l'hématozoaire dans le sang et celle du pigment noir dans l'urine, « ... ce dernier ayant l'avantage d'être le plus constant des deux », ne manque-t-il pas d'ajouter.

La méthode d'Urriola n'est pas exempte de critiques : aucune preuve irréfutable ne permet d'affirmer que les pigments trouvés dans l'urine sont de nature malarique, étant donné le but même de la méthode, qui est de rechercher un témoin du paludisme, en l'absence de parasites. Il faudrait pour cela mettre en évidence la concomitance de l'hématozoaire et de ces pigments, ce que n'a pas fait Urriola, et leur absence dans les cas où le paludisme peut être écarté. Il semble par ailleurs difficile de pouvoir exclure de l'urine les corps étrangers, et, comme l'indique Chambelland, il faut tenir compte du fait qu'il existe dans l'urine une coloration due à des pigments colorés qui apparaissent à l'émission ou à des chromogènes qui se transforment en pigments sous l'action de l'air, de la lumière ou des réactifs.

En 1912, Sinton ⁽⁶⁾ a cherché à vérifier chez 40 paludéens authentiques les résultats d'Urriola. Il a bien trouvé du pigment chez ces paludéens mais il a trouvé aussi des pigments d'impuretés dans l'urine de 9 personnes non paludéennes sur 40. Il peut donc y avoir une cause d'erreur, et l'auteur estime qu'il serait préférable de rechercher la présence de leucocytes pigmentés dans l'urine.

Des constatations analogues ont été faites par Steinfeld et Langeron ⁽⁷⁾ et corroborées par de nombreux observateurs.

On peut donc conclure qu'il est impossible de distinguer dans l'urine, avec certitude, le Pm des autres pigments organiques qui peuvent s'y trouver.

En résumé, la signification diagnostique que veulent assigner au Pm dans le sang et dans l'urine Risquez et Urriola ne paraît pas devoir être retenue, car les méthodes préconisées sont sujettes à trop d'erreurs. La présence de Pm libre ne doit être prise en considération qu'avec de grandes réserves. Seule, la constatation dans le sang de Pm intracellulaire, en l'absence d'hématozoaire, a quelque valeur et apporte une bonne confirmation au diagnostic clinique de la malaria.

C. — *Applications pratiques du Pm au diagnostic du paludisme.*

1° *Réactions cutanées et Pm.* — Après avoir démontré la solubilité du Pm dans le plasma et, par suite, la possibilité de la part de l'organisme de former des anticorps vis-à-vis du Pm, qui se comporte comme un antigène, Rocchi a essayé de mettre en évidence d'une autre façon le pouvoir antigénique du Pm et l'existence dans l'organisme paludéen d'anticorps du Pm. Il a donc utilisé ce dernier comme antigène et essayé, pour le diagnostic de l'infection malarique, les réactions cutanées (test d'ailleurs déjà employé pour le

(6) Sinton (J. A.), *Ann. of tropic. med. and paras.*, t. VI. n° 3, oct. 1912, p. 373-377.

(7) Langeron (M.), *Archives de parasitologie*, 1912, XV, p. 442.

diagnostic de nombreuses affections (parasitaires). Rocchi injecte dans le derme de paludéens de petites quantités de solution (8) phéniquée de Pm ($1/2$ cm³).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ces injections intradermiques donnent des réactions négatives chez les paludéens, et positives chez les individus sains ou atteints d'affection non paludéenne. Il y a, notons-le en passant, analogie entre cette intradermo-réaction et la réaction de Schick dans la diphtérie.

Comme contrôle, furent utilisées des solutions d'hématine pure et d'hémoglobine. Une réaction positive est marquée par une zone d'érythème de coloration et de forme variables, à bords nets et dont le diamètre est d'environ 30 millimètres. Elle débute cinq à six heures après l'injection et dure une quinzaine d'heures.

Les résultats obtenus par Rocchi sont les suivants :

chez les paludéens, la réaction est *négative* dans environ 76 p. 100 des cas;

chez les individus non paludéens, elle est *positive* dans 82 p. 100 des cas;

chez les paludéens guéris, elle est *positive* dans 93 p. 100 des cas.

Les périodes du cycle fébrile n'ont aucune influence sur cette réaction, qui, par ailleurs, est identique, quelle que soit la variété du plasmodium contenu dans le sang. Notons également que la réaction, positive chez un individu sain, devient négative si ce dernier contracte le paludisme (malariathérapie) pour redevenir finalement positive une fois l'infection guérie.

Il y aurait là une démonstration évidente de l'existence chez les individus atteints de paludisme d'anticorps antiendo-

(8) Le Pm est dissous dans une solution saturée de carbonate de lithium (2 g. de Pm en poudre pour 100 cm³ de dissolvant). La composition du dissolvant qui convient le mieux et inoffensif pour la peau est la suivante : solution saturée de carbonate de lithium, 1,3; sérum physiologique, 10. La solution à injecter est phéniquée à 0,50 p. 100.

gènes envers le Pm. Ces derniers, chez le paludéen, neutralisent l'action locale de la solution de Pm injectée dans le derme, ne provoquant ainsi aucune réaction. Par contre, chez les individus sains ou atteints d'affection non paludéenne, où ces anticorps spécifiques font défaut, la réaction est évidente. Ainsi se confirmerait la valeur du Pm comme antigène-endo-gène, et l'intradermo-réaction avec le Pm paraît pouvoir être utilisée pour le diagnostic des cas douteux de paludisme.

2° *Réactions de floculation et Pm.* — Sans vouloir juger de la spécificité des réactions de séro-floculation de Henry, mais étant données les différences profondes (nature, composition, provenance) qui séparent le Pm des mélanines, il nous a paru intéressant de rechercher si l'on ne pourrait pas obtenir une séro-floculation en utilisant le Pm comme source d'antigène, ce qui n'a jamais été tenté en raison de la difficulté à se procurer du Pm. Malheureusement, notre expérimentation n'est pas encore suffisante pour nous permettre d'apporter des résultats concluants. Il nous semble cependant qu'on doive obtenir des réactions aussi sensibles qu'avec la mélanine de la choroïde de bœuf.

CONCLUSIONS

I. — Le pigment malarique est un pigment d'origine sanguine, élaboré aux dépens de l'hémoglobine par l'hématozoaire, durant son développement dans le globule rouge et sous l'influence de l'activité vitale du parasite.

II. — Sa présence dans l'organisme est constante et, réserve faite pour la bilharziose, caractéristique du paludisme.

III. — Il possède une constitution chimique qui lui est propre. Insoluble dans l'eau, l'alcool, les dissolvants des graisses et des lipoides et les acides minéraux étendus ou concentrés, il est soluble dans les alcalis étendus et alcooliques, les acides alcooliques, le sulfure d'ammonium et, en partie, dans le plasma sanguin.

Il renferme du fer, que l'on ne peut toutefois mettre en évidence qu'après avoir disloqué la molécule pigmentaire. Sa formule chimique élémentaire est : $C_{84}H_{152}N_{20}FeO_{28}$.

Par ses caractères physico-chimiques, il s'apparente aux hématines de digestion, sans leur être absolument identique. Il se distingue strictement des autres pigments d'origine sanguine et des mélanines.

IV. — Sa distribution dans l'organisme est tout à fait caractéristique. Né dans les hématozoaires, il passe dans le sang durant les accès fébriles, est repris ensuite par les éléments du système réticulo-endothélial des divers organes, où il se dépose. On le trouve dans les leucocytes mélanifères, la rate, le foie, la moelle osseuse et l'encéphale, et occasionnellement dans l'endothélium des capillaires de l'organisme.

IV. — Du point de vue biologique, l'idée que le Pm provoquerait dans l'organisme paludéen l'apparition d'anticorps (anti-endogènes) a donné naissance à une réaction de floculation de groupe (mélano-floculation de Henry) et à des essais d'intradermo-réaction, utilisés pour le diagnostic du paludisme.

VU, POUR LE DOYEN :

L'Assesseur,

J. GUYOT.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président,

H. BONNIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 11 décembre 1933.

Le Recteur de l'Académie,

A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

- AMEUILLE (P.). — Les pigments pathologiques. *Biologie médicale*, mai 1910, t. 10, n° 4, p. 133 et 150.
- ASCOLI (V.). — Sul pigmento malarico. *Polietlinico Roma*, 1910, sez. méd., vol. XVII, p. 246-255 (travail présenté au Congrès de Budapest en 1910).
- Beitrag zur Bildung des malaria pigments. *Münch. Med. Wochenschrift*, nov. 1910, n° 44, t. 2.
- La Malaria, Turin, 1913.
- BALL (B.). — Dict. encyclop. des sc. médicales, art. « Mélanémie », 1873 (contient un exposé détaillé de l'histoire de la mélanémie).
- BOISSON. — Sur les pigments paludéens. *Lyon médical*, 1896, t. I, n° 13, p. 504-506, et *Province médicale*, Lyon, 1896, t. X, p. 165-166.
- BROWN (W. H.). — Malarial pigment (so called melanin); its nature and mode of production. *Journ. of experim. medic.*, 1911, vol. XIII, n° 2, p. 290-299.
- The relation of hematin to pathological pigment formation. *Journ. of experim. medic.*, 1911, vol. XIV, p. 612-622.
- Malarial pigment (hematin) as a factor in the production of the malarial paroxysm. *Journ. of experim. medic.*, 1912, vol. XV, n° 6, p. 579-597.
- Malarial pigment (hematin) as an active factor in the production of the blood picture of malaria. *Journ. of experem. medic.*, 1913, vol. XVIII, n° 1, p. 96-106.
- BUTTERFIELD (E. E.) et BENEDIET (L. S.). — On the alleged rôle of hematin in the production of the malarial paroxysm. *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, N. Y., 1913-1914, vol. XI, n° 3, p. 80-82.

- CARBONE (T.). — Sulla natura chimica del pigmento malarico. *Giorn. della R. Accadem. di medic. di Torino*, 1891, XXXIX, p. 901-906.
- CASTELLANI (A.) et CHALMERS (A. J.). — Manual of tropic. medic., 3^e éd., London, 1919.
- CHANDRA-BASU-CHARU. — Observations on the chemical behaviour of malarial pigment. *Ind. Journ. of medic.*, 1921-1922, vol. 2, n° 1, p. 328-331.
- CHANTEMESSE (A.) et PODWYSSOTSKY (W.). — Les processus généraux, 1901, t. 1, p. 306 (cet ouvrage donne une bibliographie importante sur le Pm).
- CLEMENS (J. R.). — Melaniferous leucocytes in the diagnosis of malaria. *Saint-Louis Med. Rev.*, 1906, LIII, p. 560.
- COMES (S.). — Appunti di biologia malarica : modo di nutrizione e genesi del pigmento nel parassita malarico (nota terza). *Arch. f. Protistenk. Jená*, 1922, Bd 45, n° 3, p. 401-409.
- DIONISI (A.). — Sulla biologia dei parassiti malarici nell' ambienti. *Policlin.*, Roma, 1898, V, Sez. med., p. 419-424.
- EWING (J.). — Contribution to the pathological anatomy of malarial fever. *Journ. of experim. medic.*, Balt. 1905, VI, p. 119-180.
- FACCIOLA (L.). — La melanemia nel infezione malarica. *Malariologia*, Napoli, 1919, XII, p. 123-142.
- GLASUNOW (M.). — Chemisch-spektroskopische Eigenschaften des malariapigmentes. *Virch. archiv. f. path. anat.*, Berl., 1923, CCLV, p. 295-302.
- GRALL (Ch.) et CLARAC (A.). — Traité de pathologie exotique, article « paludisme », 1910, t. 1.
- HALLOPEAU (H.). — Dict. de méd. et de chirurg. pratiques, article « Mélanémie », 1876, t. XXII, p. 33 (On y trouve une bibliographie très complète sur la mélanémie).
- HAMELIUS. — De la mélanémie dans les fièvres intermittentes. *Arch. méd. belges*. Brux., 1864, XXXIV, p. 129-134.
- HAMMOND (W. A.). — On pigmentary deposits in the brain, resulting from malarial poison. *Tr. Am. neurol. Ass.*, N. Y., 1873, I, p. 142-156.

- HARRIS (H. H.). — Upon the pigment and plasmodia in the tissues of pernicious malaria. *N. Orl. M. et S. J.*, 1911-1912, LXIV, p. 455-460.
- HELLY (K.). — Zur Rolle der Milz und der Leber bei malaria. *Munch. Med. Woch.*, 1918, n° 35, p. 955-957.
- HUECK (W.). — Pigmentstudien. *Beitr. z. allg. path. u. pathol. anat.*, 1912, LIV, H. 1, p. 68-232.
- Die hämatogenen Pigmente. *Handb. der allgem. Pathol. Krehl und March*, 1914.
- Die Pathologische Pigmentierung. In *Handb. der Allgem. Pathol. Krehl und March.*, 1921, Bd 3, 2 abt.
- KELSCH (A.). — Observations sur la mélanémie et la mélanose palustres. *Arch. de phys. norm. et pathol.*, Paris, 1875, t. VII, p. 690-734.
- Contribution à l'histoire des maladies palustres; de la mélanémie. *Arch. gén. de méd.*, Paris, 1880, t. 5, CXLVI, p. 385-413.
- KELSCH (A.) et KIENER (P. L.). — Traité des maladies des pays chauds. Paris, Baillière, 1889, p. 394-413.
- KIENER (P. L.). — Remarques sur les pigmentations d'origine hémattique des tissus et des humeurs dans les fièvres et dans les cachexies. *Gaz. hebd. des Sc. méd. de Montpellier*, 1886, VIII, p. 64-73 et 181-185.
- KÓSA (M.). — Die chemische natur des malariapigments und seine stellung in der Gruppe hämoglobinogener Pigmente. *Virch. arch. f. path. anat.*, Berl., 1925, CCLVIII, p. 186-205 (On y trouve une bibliographie détaillée sur la chimie du Pm).
- LAMBERT (R. A.) et DE OLIVEIRA (A. B.). — Contribuição ao estudo da pigmentação paludica. *Rev. de med.*, S. Paulo, 1925, VII, p. 23-25.
- Pathological studies in malaria with special reference to pigmentation and spleen size. *Rev. pub. Health et Trop. med.*, Porto-Rico, janv. 1929, IV, p. 299-307.
- LAVERAN (A.). — Sur le pigment noir palustre. *Comptes rendus de la Société de biologie*, Paris, 1897, 10^e série, t. IV, p. 443-445.

- Traité du paludisme, 1907, 2^e édit., Masson, Paris, p. 351-360 (contient l'histoire très complète de la mélanémie).
- LE DANTEC (A.). — Précis de pathologie exotique, 4^e édit., 1924, t. 1, p. 250-256.
- LÉVY-VALENSI (A.) et MONTPELLIER (J.). — Le système réticulo-endothélial dans le paludisme. *L'Algérie médicale*, juillet 1932, p. 413-417.
- Le blocage du système réticulo-endothélial dans le paludisme. *Comptes Rendus II^e Congrès international du paludisme*, Alger, 1930, t. I, p. 645.
- LIGNAC (G. E. O.). — Over haemoglobinogene pigmenten het malaria-pigment in het bijzonder. *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.*, 1923, déc., n^o 25, 2nd Half, p. 2671-2676.
- MANSON (G.). — Appearance of pigmentation in lymphocytes in relation to the diagnosis of malaria. *Brit. M. J. Lond.*, 1898, II, p. 881.
- Maladies des pays chauds, 1908.
- MARCHOUX. — Nouveau traité de médecine et de thérapeutique, article « Paludisme », 1926, t. V, J.-B. Baillière et fils.
- MAXWELL (J. S.). — Risquez test (for melanin in blood). *Journ. of Trop. med. and hyg.*, oct. 1930, t. 33, p. 289-292.
- MAYER (E.). — Ueber eisenreaktion am malaria-pigment *Virch. Archiv. f. path. anat.*, 1922-1923, déc. 30, Bd CCXL, p. 117-126.
- MOSTO (D.). — Melanosis paludica. *Actas y Trabajos del Tercer Congreso nac. de med. Paludismo*, t. 1, Buenos-Ayres, 1926, p. 633.
- Melanosis paludica. *Semana med.*, 9 janv. 1930, n^o 2, p. 85-88.
- MÜLHENS (G.). — Die Plasmodien. *Handb. d. path. f. Protozoen. v. Provazek*, Bd 3, Leipz., 1921, p. 1478.
- PLÖTZ (P.). — Ueber das Pigment der malarischen Pigment leber und milz. *Hoffe Seglers med. Chem. Untersuch.*, Berlin, 1871, IV, p. 588.
- RIBEYRO (R. E.) et BAMBAREN (C. A.). — El pigmento malárico en la urina de los paludicos. *Crón. méd.*, Lima, 1913, XXX, p. 133-136.

- RISQUEZ (F. A.). — Le signe du pigment hématique. *Rev. de méd. et d'hyg. trop.*, Paris, 1925, sept.-oct., XVII, n° 5, p. 204-207.
- El pigmento malarico en el Paludismo. *Z. G. Bern. Nocht.*, Hambourg, 1927, XXVI, p. 461-463.
- El pigmento melanico en el Paludismo. *Gac. méd. de Caracas*, 1930, nov. 30, n° 10, p. 149-151.
- ROCCHI (F.). — Ricerche sul pigmento malarico con speciale riguardo alle reazioni di Henry. *Arch. ital. di anat. e. istol. patol.*, juill.-août 1930, n° 4, p. 613-627.
- Intradermoreazioni e anticorpi verso il pigmento malarico. *Rivista di Malariologia*, marzo-aprile 1931, t. II, p. 161-182.
- SAKHAROFF (N. A.). — On the relation of malarial pigment to haemoglobin and paranuclein and their value for biology. *Med. Sbornik*, Tiflis, 1896, n° 59, p. 27-42.
- On the origin of malarial pigment and hemoglobin; morphological investigations. *Russk. arch. pathol. Klin. Med. u. bakter.*, S. Péterb., 1896, t. 1, p. 157-168, et t. II, p. 609; Also *Protok. zased. kavkazsk. med. Obsh.*, Tiflis, 1895-1896, XXXII, p. 347-351. *Centralbl. f. Bakteriolog.*, 1 abt, Jena, 1896, XX, p. 12-22.
- SALVATORE (D.). — Il pigmento ematico nelle urine dei malarici. *Giorn. di med. mil.*, Roma, 1912, LX, p. 82-103.
- *Il Policlin. sez. prat.*, fasc. 20, 1913.
- SCHAUDINN (F.). — Studien über krankheit serregende. *Protoz II, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, Bd XIX, 1902-1903, p. 169.
- SEYFARTH. — Chemische untersuchungen des Malariapigments. *Verhandl. d. Dtsch. Pathol. Gesselsch.*, Jena, 1921, XVIII, p. 303-311; *Zentralbl. f. Allg. Pathol. u. path. anat.*, 1921, Bd XXXI.
- Malaria parasiten und malariapigment befunde in der Leiche. *Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg.*, 1924, Bd XXVIII, p. 355-358.
- STEINFELD (F.). — Über die diagnostische Bedeutung des Malaria-pigmentes. *Arch. f. Schiffs. u. Tropen. Hyg.*, 1929, Bd XXXIII, p. 631-635.

STEVENSON (A. C.). — A note on the solubility of malarial Pigment.
Journ. of Trop. Med., 13 déc. 1917, XX, n° 24, p. 277.

STIEDA (H.). — Einige histologische Befunde bei tropischer malaria
(Eisenreaktion). *Zentralbl. f. allg. Path.*, 1893, IV, p. 321.

TOMMASI-CRUDELI (C.). — Alterations in the red blood-corpuscles from
the action of malaria. *Indian M. Gaz.*, Calcutta, 1886, XXI,
p. 7-10.

Les altérations des globules rouges du sang dans l'infection
malariaque. *Congr. périod. internat. des Sc. méd.*, II, sect.
de méd., p. 23-29.

URRIOLA (C.-L.). — Sur un nouveau signe pathognomonique du pa-
ludisme. *Semaine médicale, Paris*, 1911, 4 janv., XXXI,
n° 1, p. 3-5.

— La valeur diagnostique du pigment hématique dans la
malaria. 1924, Paris, Vigot, 8°, 100 p.

VALENTI (A.). — Etiologia e patogenesi della melanemia e della
infezione malarica. *Gazz. med. di Roma*, 1890, XVI, p. 257-
281.

VERNE (J.). — Les pigments dans l'organisme animal. *Encyclop.*
scientif., Doin, Paris, 1926.

— Couleurs et pigments des êtres vivants. *Collect. A. Colin*, Pa-
ris, 1930.

— Les données biologiques du problème pigmentaire des inver-
tébrés à l'homme. *Biol. médic.*, nov. 1931, n° 9, p. 385-
422.

VERNONI (G.). — Sulla formazione in vitro di pigmenti neri emoglo-
binici. *Lo sperimentale Archiv. di biolog. norm. et pato-*
log., 1925, VI, fasc. 1, p. 5-21.

— Sulla produzione in vitro di pigmenti neri di derivazione
emoglobinica. *Lo sperimentale*, 1925, p. 1013, nota II.

WARASI (W.). — Das malaria pigment und seine chemische natur.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg., sept. 1927, Bd 31, n° 8,
p. 428-431.

— Ueber die Entstehung des malariapigments. *Arch. f. Schiffs.*
u. Trop. Hyg., oct. 1928, Bd 32, n° 10, p. 513-517.

WATS (R. C.) et WHITE (W. I.). — The malarial pigment (haemozoin), in the spleen *Ind. Journ. of med. research*, janv. 1932, vol. 19, n° 3, p. 945-950.

ZIEMANN (H.). — Malaria u. Schwarzwasserfieber. In *Handb. d. Tropenkrankheiten*, Leipz., 1924, Bd III, p. 173, 177, 208, 307.



